

Université de Montréal

**Déterminants virologiques de la discordance entre la
biopsie diagnostique du col et l’histologie finale au
traitement**

par Nadège Andréa Zanré

Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l’obtention du grade de maîtrise (M.Sc)
en Sciences Biomédicales
option Recherche clinique

Juin 2017

© Nadège Andréa Zanré, 2017

Résumé

Introduction : Une infection persistante aux VPH à haut risque peut causer des lésions précancéreuses de haut grade du col de l'utérus (HSIL). Les femmes diagnostiquées à la colposcopie avec HSIL sont orientées au traitement par conisation (LEEP). L'analyse du spécimen de LEEP peut confirmer le HSIL, ou démontrer une discordance en présence d'une lésion de bas grade (LSIL) ou d'une histologie normale. Ces femmes ont donc été traitées inutilement. La discordance pourrait être due à une régression des HSIL ou à une erreur de lecture.

Objectif : Déterminer les caractéristiques cliniques et virales associées à l'obtention d'un résultat normal ou de bas-grade au traitement (discordance).

Méthodes : CoHIPP est un essai contrôlé randomisé effectué dans 13 centres de colposcopie à travers le Canada, comparant les stratégies de suivi après traitement pour HSIL. Des femmes enrôlées dans CoHIPP, nous avons sélectionné et apparié 355 cas de discordance et 355 témoins concordants. Une régression logistique univariée conditionnelle et des analyses univariées ont permis de déterminer l'association entre la discordance et les caractéristiques cliniques et virales (génotype, charge virale, polymorphisme). Le génotype a été obtenu par le test Hybrid Capture 2 ainsi que le Linear Array, la charge virale par PCR en temps réel et le polymorphisme par séquençage.

Résultats : L'âge et le délai entre le diagnostic et le traitement étaient similaires pour les cas et les témoins. L'absence de VPH à haut risque au traitement est associée à une augmentation du risque de discordance (OR : 23,60 95% CI: 9,83-74,03). Les types 16, 31, 33 ou 52 étaient significativement associés à une diminution du risque de discordance. L'association entre le VPH16 (comparé à l'absence de VPH ou la présence de VPH à bas risque) et la discordance était la plus forte. La charge virale ainsi que les analyses de polymorphisme ne sont pas de bons prédicteurs de la discordance.

Discussion/Conclusion : Des recherches futures devraient investiguer l'usage d'un test générique pour VPH à haut risque pour identifier les femmes avec une biopsie diagnostique HSIL qui pourrait être suivies au lieu d'être traitées.

Mots-clés : Conisation cervicale, LEEP, VPH, Lésions intraépithéliale de haut grade

Abstract

Introduction: A persistent infection by high-risk HPV can cause high-grade cervical lesions (HSIL). Women diagnosed by biopsy-proven HSIL undergo treatment by conisation (LEEP). LEEP can confirm HSIL or may have normal/LSIL pathology on treatment histology. Those women were treated unnecessarily. This discrepancy can be attributed to spontaneous clearance of HSIL, or errors in initial pathology readings.

Objectives: To investigate if virus-related variables are associated with normal/LSIL LEEP pathology after an HSIL biopsy (discrepancy).

Methods: CoHIPP is a randomized trial conducted in 13 colposcopy centers across Canada, comparing follow-up strategies after HSIL treatment. Out of women in CoHIPP, we selected 355 cases of discrepancy and matched them with 355 controls. We conducted conditional univariate logistic regression and univariate analysis to assess the association between clinical variables and viral variables (genotype, viral load and polymorphism). Genotype was obtained by Hybrid Capture 2 and Linear Array, viral load by real time PCR and polymorphism by sequencing.

Results: Cases and controls did not differ in terms of age and delay between diagnostic and treatment. The absence of HR-HPV at baseline (treatment) was significantly associated with an increased risk of discrepancy (OR: 23,60 95% CI: 9,83-74,03). The only HPV genotypes associated with the lowest risk of discrepancy were types 16, 31, 33 or 52. HPV 16 (compared to no HPV or low risk HPV) had the strongest association against discrepancy. Viral load and polymorphism analysis were not good predictors of discrepancy.

Discussion/Conclusions: Future research should investigate the use of generic HR-HPV testing pre-treatment to identify women with HSIL biopsy who could be safely followed-up instead of being treated.

Keywords : Cervical conization; LEEP; HPV; High-grade squamous intraepithelial lesion

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles.....	ix
Remerciements.....	xii
Déclaration de l'étudiante.....	xiii
Introduction.....	1
Revue de la littérature.....	3
1. Organisation génomique et structure des VPH.....	3
1.1. Région non codante.....	3
1.2. Régions précoces.....	4
1.3. Régions tardives.....	6
2. Taxonomie des papillomavirus.....	6
3. Maladies causées par les VPH.....	13
3.1. Verrues cutanées.....	14
3.2. Verrues génitales.....	14
3.3. Papillomatose respiratoire récurrente.....	14
3.4. Epidermodysplasia verruciformis.....	15
3.5. Syndrome WHIM.....	15
3.6. Affections pré-néoplasiques et néoplasiques.....	16
4. Transmission.....	17
5. Cycle viral des VPH.....	18
5.1. Infection et zone de transformation.....	18
5.2. Attachement et entrée du virus.....	19
5.3. Maintien du génome viral.....	20
5.4. Phase proliférative et amplification du génome viral.....	23
5.5. Encapsidation et relâche.....	23
6. Histoire naturelle des maladies pré-néoplasiques et néoplasiques du col.....	24

7.	Facteurs de risque de développement du cancer du col de l'utérus.....	28
7.1.	Facteurs viraux.....	28
7.1.1.	Types.....	28
7.1.2.	Infections multiples.....	29
7.1.3.	Charge virale.....	29
7.2.	Facteur de l'hôte	30
7.2.1.	Prédisposition génétique	30
7.2.2.	Statut immunitaire.....	30
7.2.3.	Parité	31
7.3.	Facteurs environnementaux	31
7.3.1.	Tabagisme	31
7.3.2.	Contraceptifs oraux.....	32
7.3.3.	Présence d'autres infections transmissibles sexuellement.....	32
8.	Prévention du cancer du col de l'utérus.....	33
8.1.	Pap test.....	33
8.2.	Test VPH.....	39
8.3.	Procédures diagnostiques suite à un test de dépistage anormal.....	40
9.	Traitement des lésions précancéreuses du col	41
10.	Discordance.....	43
	Objectifs.....	48
	Matériel et méthodes.....	49
1.	Population source et population à l'étude.....	49
2.	Devis d'étude	50
3.	Issues : définition des cas et des témoins.....	51
4.	Variables virales d'intérêt : définitions et mesures.....	51
4.1.	Test Hybrid capture 2.....	52
4.2.	Préparation des contrôles	53
4.3.	Traitements des spécimens dans un milieu cytologique liquide PreservCyt	53
4.4.	Hybridation des spécimens dénaturés.....	53
4.5.	Purification d'ADN par Master Pure	55
4.6.	Détection des VPH par Linear Array.....	56

4.7. Charge virale.....	57
4.8. Protocole pour le séquençage.....	61
5. Analyses statistiques	64
Résultats.....	66
1. Caractéristique des participantes.....	66
2. Distribution des génotypes de VPH.....	67
3. Association entre le génotype et le risque de discordance.....	70
4. Analyse multivariée : l'âge influence-elle l'association entre différents facteurs viraux et la discordance?	73
5. Association entre la charge virale et le risque de discordance.....	74
6. Polymorphisme de la région du LCR du VPH16.....	76
7. Diversité des variantes du VPH16	80
8. Association entre le polymorphisme de la région du LCR de VPH16 et la discordance	81
9. Polymorphisme de la région du LCR du VPH18.....	82
10. Diversité des variantes du VPH18	85
11. Association entre le polymorphisme de la région du LCR du VPH18 et la discordance	85
12. Polymorphisme de la région du LCR du VPH31.....	86
13. Diversité des variantes du VPH31	89
14. Association entre le polymorphisme de la région du LCR du VPH31 et la discordance	90
Discussion.....	91
1. Résumé des principaux résultats et comparaison avec la littérature.....	91
2. Forces et limites	99
3. Contrôle de biais et confusion.....	100
4. Perspectives futures	102
Conclusion	104
Bibliographie.....	i
Annexe 1. Liste de centres de colposcopie inclus dans COHIPP	i
Annexe 2: Organigramme de l'étude CoHIPP.....	ii

Annexe 3. Résultats TFSEARCH pour le prototype VPH16	iii
Annexe 4. Résultats TFSEARCH pour la variante Sb-2 (mutation 7521)	ix
Annexe 5. Permission d'utilisation de figures	xv

Liste des tableaux

Tableau I. Classification des VPH en fonction de leur pouvoir oncogène.....	11
Tableau II. Classification de Bethesda 2014	36
Tableau III. Résumé des études portant sur la discordance.	45
Tableau IV. Détails des protocoles de séquençages utilisés pour la charge virale.....	63
Tableau V. Amorces utilisées pour les réactions de PCR d'amplification et de séquençage..	63
Tableau VI. Caractéristiques des participantes et des épisodes de soins.....	67
Tableau VII. Fréquence des types de VPH au moment du traitement	69
Tableau VIII. Présence de génotypes de VPH à haut risque et nombre de génotypes	70
Tableau IX. Association entre l'absence de certains génotypes au moment du traitement et la discordance	72
Tableau X. Association entre différents facteurs viraux et la discordance.....	74
Tableau XI. Charge virale pour les types 16, 18 et 31	76
Tableau XII. Polymorphisme du VPH16 dans la région LCR.....	78
Tableau XIII. Association entre le polymorphisme du VPH16 et la discordance	82
Tableau XIV. Polymorphisme du VPH18 dans la région LCR.....	84
Tableau XV. Association entre le polymorphisme du VPH18 et la discordance	86
Tableau XVI. Polymorphisme du VPH31 dans la région du LCR.....	88
Tableau XVII. Association entre le polymorphisme du VPH31 et la discordance.....	90

Liste des figures

Figure 1. Organisation génomique du VPH16	4
Figure 2. Classification des papillomavirus basée sur un arbre phylogénétique utilisant la ORF du gène L1 de 189 types de PVs.	8
Figure 3. Cycle de vie des VPH dans un épithélium cervical.....	22
Figure 4. Histoire naturelle de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus	26
Figure 5. Résumé du processus de dépistage des lésions précurseurs du cancer du col de l'utérus au Canada.....	41
Figure 6. Définition de la discordance.....	44
Figure 7. Organigramme simplifié de la présente étude.	50
Figure 8. Box-plot de la charge virale pour les types VPH16, VPH18 et VPH31 chez les cas de discordance et les témoins concordants	75
Figure 9. Diversité des variantes du VPH16.....	80
Figure 10. Diversité des variantes du VPH18.....	85
Figure 11. Diversité des variantes du VPH31.....	89

Liste des sigles

ADN : Acide désoxyribonucléique

Af1 : Africaine 1

Af2 : Africaine 2

AIS : Adénocarcinomes endocervicaux in situ

ARN : Acide ribonucléique

As-Am : Asiatique-Nord-Américaine

ASC : Cellules Squameuses Atypiques

ASC-H : Cellules squameuses atypiques ne pouvant pas exclure une lésion malpighienne intraépithéliale de haut grade

ASC-US : Cellules squameuses atypiques de signification indéterminée

ATP : Adénosine triphosphate

CIN1 : Néoplasie intraépithéliale de grade 1

CIN2 : Néoplasie intraépithéliale de grade 2

CIN3 : Néoplasie intraépithéliale de grade 3

CIS : Carcinome In Situ

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CT: Chlamydia Trachomatis

CoHIPP : Colposcopy versus HPV testing to Identify Persistent Precancers post treatment

DNR : Réactif de Dénaturation

DS : Déviation Standard

EGF : Facteur de Croissance Endodermique

EIQ : Écart interquartile

Eur : Européenne

FDA : Food and Drug Administration

HC2 : Test Hybrid Capture 2

HLA : Human Leukocyte Antigen

HNSCC : Carcinome de la Tête et du Cou Épidermoïde

HR-VPH : VPH à haut risque

HSIL : Lésions Intraépithéliales de Haut Grade

HSV : Virus Herpès Simplex
 IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer
 IC : Intervalle de Confiance
 ICTV : International Committee of Taxonomy of viruses
 ITS : Infection Transmises Sexuellement
 Kb : Kilobase (1000 pb)
 KIR : Killer immunoglobine-like receptor
 LA: Linear Array
 LCR : Long Control Region
 LEEP : Excision électro-chirurgicale à l'anse diathermique
 LLETZ : Excision électro-chirurgicale large à l'anse diathermique de la zone de transformation
 LR-HPV : VPH à bas risque
 LSIL : Lésions malpighiennes intraépithéliales de bas grade
 MM : Master Mix
 OR : Odds ratio
 ORF: Cadre ouvert de lecture
 Pap : Papanicolaou
 Pb : Paire de base
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PK : Protéinase K
 pRb : Protéine du rétinoblastome
 PV : Papillomavirus
 RPM : Rotation par minute
 RRP : papillomatose respiratoire récurrente
 STM : Tampon de préparation de spécimen
 Tap : Transporteur associé au traitement de l'antigène
 TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
 UV : Ultraviolet
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
 VLP : Viral Like Particle
 VPH : Virus du Papillome Humain

*Je dédie ce mémoire à
mes chers parents, Jules et Haguiara Zanré
mon frère et mes sœurs, Franck, Laure et Christelle Zanré
mes directeurs, Dre Marie-Hélène Mayrand et Dr François Coutlée
mes amis et collègues qui m'ont aidée et soutenue de près comme de loin.*

Remerciements

Une page de remerciement n'est simplement pas assez pour exprimer ma gratitude à tous ceux et celles qui m'ont aidée dans mon cheminement.

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes sans lesquelles ce projet n'aurait pas été possible. Merci à mes directeurs, le Dre Marie-Hélène Mayrand et le Dr François Coutlée. Vous avez été de réels mentors. Vous m'avez permis de voir la recherche à travers vos yeux. Vous m'avez permis de découvrir un monde passionnant et par le fait même me découvrir un peu plus. Pour chaque présentation par affiche, chaque présentation orale, chaque congrès vous avez été présents et disponibles. Merci pour votre patience, vos conseils et votre support. Durant cette maîtrise, j'ai découvert et redécouvert la recherche. Je ne saurai vous remercier assez pour ce que vous avez fait pour moi.

Merci à ma famille et mes amis qui m'ont encouragée et supportée durant cette maîtrise. Vous avez été à mes côtés durant chaque étape. Vous m'avez encouragée et permis de garder les yeux sur mes objectifs.

Un grand merci à toute l'équipe du Dr Coutlée. Depuis mon stage de fin de Baccalauréat, vous m'avez enseigné et supporté. Bien plus que des collègues, vous êtes devenues des amies. Merci à Julie Guenoun, Emilie Comète et Pierre Forest. Ce fut un plaisir d'apprendre à vos côtés et de partager tant de merveilleux moments avec vous.

Merci à ma famille de la recherche clinique, Julie Lacaille et Vanessa Brunetti. Cette maîtrise n'aurait pas été la même sans vous. Merci pour tout, pour votre aide, vos conseils et votre amitié.

Un merci tout spécial à Aude-Christine Guédon pour son aide précieuse en matière d'analyses statistiques et à Josiane Chagnon-Choquet et au laboratoire du Dr. Michel Roger pour le service de séquençage.

Sans oublier toute l'équipe ayant œuvré pour la réussite de CoHIPP ainsi que les organismes subventionnaires.

Déclaration de l'étudiante

Lors de ce projet de maîtrise, j'ai effectué la purification de l'ADN par Master Pure pour tous les échantillons étudiés. J'ai aussi effectué les manipulations et l'interprétation du test de génotypage (Linear Array). Les tests GP5+-GP6+ ont été effectués par Pierre Forest. J'ai effectué les tests et interprétations de charge virale en collaboration avec Emilie Comète. J'ai effectué les tests et interprétation du séquençage. Le test Hybrid Capture 2 a été fait et interprété par Julie Lacaille.

J'ai effectué les analyses statistiques reliées à ce projet de mémoire. Ce projet de maîtrise fera l'objet d'une publication dans laquelle je participerai.

Présentations :

Orale :

Zanre N, Brunetti VC, Lacaille J, Jodoin, A, Coutlée F, Trottier H, Abrahamovicz M, Guédon AC, Mayrand MH and the Cohipp study team, Discrepancy between cervical diagnostic biopsy and treatment histology: clinical and viral determinants, Canadian national medical student research symposium (2017), University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada, June 7th 2017

Zanré N, Coutlée F, Trottier H, Pelletier A, Forest P, Mayrand M-H. Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement : corrélation avec le génotype des VPH, Journée des Étudiants, Stagiaires et Résidents du Réseau SIDA et Maladies Infectieuses / FRSQ, Hôtel Méridien-Versailles de Montréal, Montréal, Québec, Canada, 30 Octobre 2015

Zanre N, Brunetti VC, Lacaille J, Jodoin, A, Coutlée F, Trottier H, Abrahamovicz M, Guédon AC, Mayrand MH et l'équipe Cohipp, Discordance entre la biopsie diagnostique du col de l'utérus et l'histologie de traitement : déterminants cliniques et virologiques, Présentations étudiantes du CRCHUM, Centre de recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada, 23 février 2016

Poster :

Zanré N, Coutlée F, Trottier H, Pelletier A, Forest P, Mayrand M-H. Discordance between cervical biopsy and LEEP histology is strongly correlated with HPV genotypes, 30th International Papillomavirus Conference, Lisboa Congress Centre, Lisbon, Portugal, 17-21 September 2015.

Zanre N, Brunetti VC, Lacaille J, Jodoin, A, Coutlée F, Trottier H, Abrahamovicz M, Guédon AC, Mayrand MH and the Cohipp study team, Discrepancy between cervical diagnostic biopsy and treatment histology: clinical and viral determinants, Canadian national medical student research symposium (2017), University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada, June 7th 2017

Zanré N, Coutlée F, Trottier H, Pelletier A, Forest P, Bentley J, Ehlen T, Ellit L, Lau S, Lee M, Mayrand M-H, Discordance entre la biopsie diagnostique du col de l'utérus et l'histologie de traitement : déterminants cliniques et virologiques, 18ème Congrès des étudiants du CRCHUM, Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada, 4 mai 2016

Prix :

Lors de la Journée des Étudiants, Stagiaires et Résidents du Réseau SIDA et Maladies Infectieuses / FRSQ, la présentation orale effectuée reçu le prix de meilleure présentation à la chez les étudiants à la maîtrise.

Introduction

Le cancer du col de l'utérus est le quatrième cancer féminin le plus fréquent dans le monde [1]. Depuis les années 90, il est bien établi qu'une infection persistante par un virus du papillome humain (VPH) oncogène est une cause nécessaire mais non suffisante de ce cancer [2]. Cette découverte a d'ailleurs valu le prix Nobel de physiologie ou de médecine de 2008 au virologue allemand Harald zur Hausen. De nombreuses études ont permis de mieux comprendre le lien de causalité entre le VPH et le cancer du col utérin. Cette association est même plus forte que celle qui existe entre le cancer du poumon et le tabagisme [3]. Jusqu'à présent, aucune autre alternative causale n'a été décrite pour le cancer du col utérin [4].

Le développement d'un cancer du col se fait par étape. Chaque étape est intimement liée aux caractéristiques du virus et à celles de l'hôte. La majorité des infections aux VPH sont éradiquées par le système immunitaire de l'hôte [5]. Seuls certains types de VPH, appelés VPH à haut risque ou VPH oncogènes, peuvent engendrer des lésions précancéreuses. La persistance d'une infection augmente son risque de progression des lésions. Si elles ne sont pas traitées, ces lésions peuvent évoluer en cancer du col utérin [6]. La compréhension de l'histoire naturelle du cancer du col a permis d'établir des méthodes de dépistage efficaces. Le but principal du dépistage est de détecter les lésions précancéreuses et de les traiter, évitant ainsi leur progression vers le cancer. Le test de dépistage utilisé est le test Papanicolaou (test Pap), un test de frottis cervical. Lorsqu'une femme obtient un résultat anormal au test Pap, elle est référée en colposcopie pour établir un diagnostic. Une biopsie diagnostique peut alors être faite. Si la biopsie diagnostique affiche des lésions de haut grade, la femme est dirigée en traitement. Le traitement se fait par conisation. La conisation par bistouri ou par LEEP (excision électro-chirurgicale à l'anse diathermique) consiste en l'excision de la zone de transformation du col en forme de cône. Le spécimen de traitement est par la suite observé pour vérifier l'état histologique de la section excisée [7]. Le traitement des lésions précancéreuses par LEEP est très efficace. Cependant, il peut entraîner de nombreuses complications obstétriques futures. Certaines études ont mis en évidence une augmentation des accouchements prématurés, des ruptures précoces des membranes et des naissances de bébés à faible poids [8, 9]. Une grande proportion des

femmes traitées sont en âge de procréer. Il est donc important d'équilibrer les risques et les bénéfices du traitement.

Plusieurs études ont rapporté qu'entre 14-24% des femmes traitées pour des HSIL n'avaient plus de HSIL au moment de la vérification du spécimen de traitement [10-17]. C'est ce que nous appelons la discordance. Ces femmes ont peut-être été traitées inutilement. Cette discordance pourrait être due à une erreur de lecture histologique du spécimen diagnostic ou du spécimen de traitement. Elle pourrait aussi être due à une régression des lésions entre le moment du diagnostic et celui du traitement.

Le présent mémoire porte sur la question de la discordance. Nous chercherons à savoir s'il existe des caractéristiques virales des VPH associées à la discordance, qui permettraient d'identifier les femmes chez qui on pourrait omettre un traitement. La réponse à cette question pourrait permettre une meilleure prise en charge des femmes avec un diagnostic de lésion précancéreuse du col. De nombreux traitements invasifs pourraient aussi être évités.

Revue de la littérature

1. Organisation génomique et structure des VPH

Les papillomavirus (PVs) sont de petits virus sans enveloppe (45 à 55 nanomètres de diamètre) possédant une capsid. La capsid est formée de 72 capsomères disposés selon une symétrie icosaédrique. L'ADN des PVs est circulaire, double brin avec une taille de 8 Kb (**figure 1**) [18]. Le fait qu'ils n'aient pas d'enveloppe lipoprotéique les rend résistants aux détergents et à la dessiccation. Un seul brin codant possède les cadres ouverts de lecture (ORF) [19]. Sans compter les protéines produites par épissage alternatif, ces virus peuvent exprimer au moins 8 protéines [20]. Le génome des papillomavirus est divisé en trois sections. Une région régulatrice non codante, appelée région LCR ou Long Control Region, et deux régions codantes. Une région codante contient les gènes exprimés de façon précoce E1 à E7 codant pour des protéines non structurales. La région précoce occupe plus de 50% du génome viral et contient six cadres ouverts de lecture [21]. Les protéines E6 et E7 sont uniformément exprimées dans les cancers du col. Ces oncoprotéines sont impliquées dans l'immortalisation, la transformation et le maintien du phénotype viral [22]. L'autre région codante contient les gènes tardifs, L1 et L2. Ces gènes codent pour des protéines structurales formant la capsid [19] et représentent 40% du génome viral [21]. La figure 1 illustre le génome du PV Papillomavirus de type 16 infectant les humains, le VPH16.

1.1. Région non codante

La région non codante LCR occupe 10% du génome viral, soit un segment d'environ 850 paires de bases. La LCR est une région variable du génome. Elle contient l'origine de réplication virale, les promoteurs des gènes précoces ainsi que des sites de liaisons de plusieurs facteurs de transcription [21]. La région LCR du type 16 contient deux promoteurs majeurs (p97 et P670). Le promoteur p97 est l'équivalent du P105 pour VPH18 et P99 chez VPH31. Le promoteur P670 du VPH16 est l'équivalent du P742 pour VPH31. P670 est un promoteur des gènes tardifs. Son activité est induite seulement dans les kératinocytes différenciés [21].

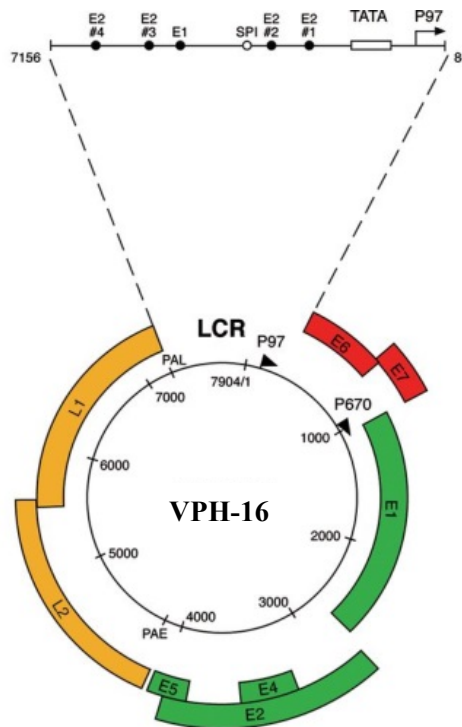


Figure 1. Organisation génomique du VPH16. Modifié de Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond), 110(5), 525-541. doi:10.1042/CS20050369

1.2. Régions précoces

Le gène précoce E1 code pour une protéine qui permet le déroulement de l'ADN viral en présence d'ATP. Elle rend possible la réplication du génome viral [23]. La protéine E2 joue aussi un rôle dans la réplication des PVs en permettant la coactivation de la réplication virale [24]. En se fixant sur la boîte TATA des promoteurs dans la région du LCR, E2 peut créer un encombrement stérique empêchant l'expression des oncoprotéines E6 et E7 [25]. Une ORF avait initialement été décrite pour le gène E3. Cependant, aucune protéine n'est encodée par ce segment [21]. Le gène E4 est emboîté dans le gène E2. Même s'il s'agit d'un gène précoce, la protéine E4 est exprimée assez tardivement, juste avant les protéines L1 et L2. La principale protéine produite par E4 est une protéine de fusion E1^{E4}. Elle est clivée en structures multimériques. Ces structures lient les cytokératines et favorisent par le fait même la destruction du cytosquelette. E4 semble aussi être impliquée

dans la relâche et la transmission du virus [24]. La protéine E5 est une petite protéine transmembranaire hydrophobe située au niveau du système endomembranaire. E5 possède une activité qui stimule la prolifération cellulaire, cette activité est complémentaire à celle de la protéine E7 [26]. Il existe plusieurs genres de PVs, ils seront expliqués plus loin. On retrouve fréquemment E5 chez les VPH du genre Alpha. Les genres Béta, Gamma et Mu ne possèdent pas de protéine E5 [24]. Chez les alpha-PVs, E5 permet au virus d'échapper au système immunitaire en interagissant avec l'EGF (facteur de croissance endodermique). Cette interaction résulte en une diminution de l'expression du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I à la surface du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi [27]. À cause de cela, E5 a été décrite comme une oncoprotéine [21]. Les oncoprotéines principales des VPH sont les protéines E6 et E7. E6 est impliquée dans la transformation cellulaire. Cette protéine de 150 acides aminés possède un motif doigts de zinc (quatre motifs Cys-X-X-Cys) lui permettant de pénétrer le noyau cellulaire [28]. La cible principale d'E6 est la p53 [20]. La protéine E6 des types de VPH ne causant pas de cancers est moins efficace pour inactiver la p53 que celle des VPH oncogènes [22]. E6 produit une ubiquitination de la p53 entraînant sa dégradation par le protéasome. La p53 étant un facteur de transcription important permettant la réparation de l'ADN, sa dégradation entraîne une accumulation des dommages à l'ADN. La protéine E6 est aussi directement impliquée dans le blocage de l'apoptose, la modulation de la signalisation par une protéine G et l'induction de l'activité de la télomérase. E6 a la capacité d'affecter la stabilité chromosomique et d'altérer la différenciation cellulaire [28]. E7 est une protéine d'environ 100 acides aminés [29]. Comme E6, E7 peut déréguler le cycle cellulaire. Sa cible principale est la famille de protéine du rétinoblastome (pRb), une protéine-clé du cycle cellulaire [20]. La protéine E7 des VPH oncogènes est en mesure de lier les pRb p105, p107 et p130. Ces trois protéines jouent un rôle dans le cycle cellulaire des cellules basales. La liaison d'E7 aux pRb entraîne la libération d'E2F. E2F permettra ensuite la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Il s'agit d'une étape critique dans le développement de la transformation cellulaire. La protéine E7 des VPH non oncogènes est moins efficace pour inactiver p105 et p107 mais elle est capable de dégrader p130. La dégradation des p130 par la protéine E7 des VPH non oncogènes facilite l'amplification du génome [30]. La ORF du gène E8 code pour une protéine de fusion E8^E2. Cette

protéine n'est pas présente dans tous les types de VPH. Il a été démontré pour le type VPH31 que cette protéine a une fonction de régulation négative de la transcription et de la réplication virale [31]. Pour certains PVs infectant les lapins, E8 a été décrite comme une oncoprotéine similaire à E5 [32].

1.3. Régions tardives

Les gènes L1 et L2 des VPH sont exprimés tardivement. Les deux protéines produites forment la capside virale. L1 est la protéine majeure de la capside. Ces protéines s'assemblent pour former des pentons L1 permettant la formation de capsomères. Les vaccins actuels utilisent des particules désignées VLP (viral like particle) similaires à la protéine L1 des VPH [33]. La région L1 est une région très conservée du génome des PVs [34]. Elle a servi de cible pour l'étude de leur taxonomie. La protéine mineure de la capside, L2, s'associe avec L1 pour l'assemblage des virions et la stabilisation de la capside. L2 facilite aussi l'entrée du virus dans le noyau de l'hôte [24].

2. Taxonomie des papillomavirus

En 1962, J.L Melnick a décrit la famille des Papovaviridae grâce à l'observation de virus par microscopie électronique. Ils possèdent un ADN double brin circulaire et une capside icosaédrique non enveloppée [35]. Cette famille inclut les PVs, les Polyomavirus et le virus vacuolisant du singe (SV40) [21]. Les polyomavirus et les PVs ont un segment homologue de 230 acides aminés. Ce domaine correspond à une hélicase située dans le segment de l'antigène T des polyomavirus et au gène E1 des papillomavirus [36]. Malgré cette homologie, la taille de leur génome et leur organisation génomique restent très différentes [34]. En 2002, les Papovaviridae ont officiellement été divisés en deux familles distinctes; les papillomaviridae et les polyomaviridae [37]. Récemment, deux virus possédant des gènes précoces semblables à ceux des polyomavirus et des gènes tardifs semblables à ceux des PVs ont été décrits [38, 39]. Ces hybrides semblent résulter d'une recombinaison [33].

Les PVs sont des virus épithéliotropes stricts. Ils infectent autant l'épithélium cutané que l'épithélium muqueux [33]. Ils sont souvent retrouvés chez les mammifères ou les oiseaux [34]. La nomenclature des PVs dépend de l'espèce infectée. Ils sont, en français, identifiés par l'abréviation VP (Virus du Papillome) accompagné d'une ou deux lettres caractérisant l'espèce hôte. Par exemple, les BVP infectent les bovins et les VPH infectent les humains [35].

Les PVs ont défié les règles de classification modernes. Étant donné qu'ils ne se soumettent pas aux méthodes classiques de culture cellulaire, on ne les désigne pas comme une lignée. De même, une classification basée sur le sérotype n'est pas possible puisque les PVs ne provoquent pas une forte réponse humorale et les antigènes viraux ne peuvent pas être produits en culture cellulaire [33]. Les cultures cellulaire classiques ne supportent pas la prolifération et la transformation par le VPH [40]. Il faudrait un épithélium en phase terminale de différenciation pour être en mesure de cultiver les VPH en laboratoire [34].

C'est en 2003 que l'International Committee of Taxonomy of viruses (ICTV) accepta officiellement une classification des PVs basée sur l'homologie de leurs séquences d'ADN (**figure 2**) [34]. Cette classification est basée sur un arbre phylogénétique résumant l'histoire de l'évolution des PVs [41]. L'arbre est construit à partir de 291 paires de bases très conservées dans la ORF du gène L1 [42]. Des classifications similaires ont été obtenues en utilisant d'autres régions du génome des VPH, mais la classification par L1 reste la plus utilisée [18].

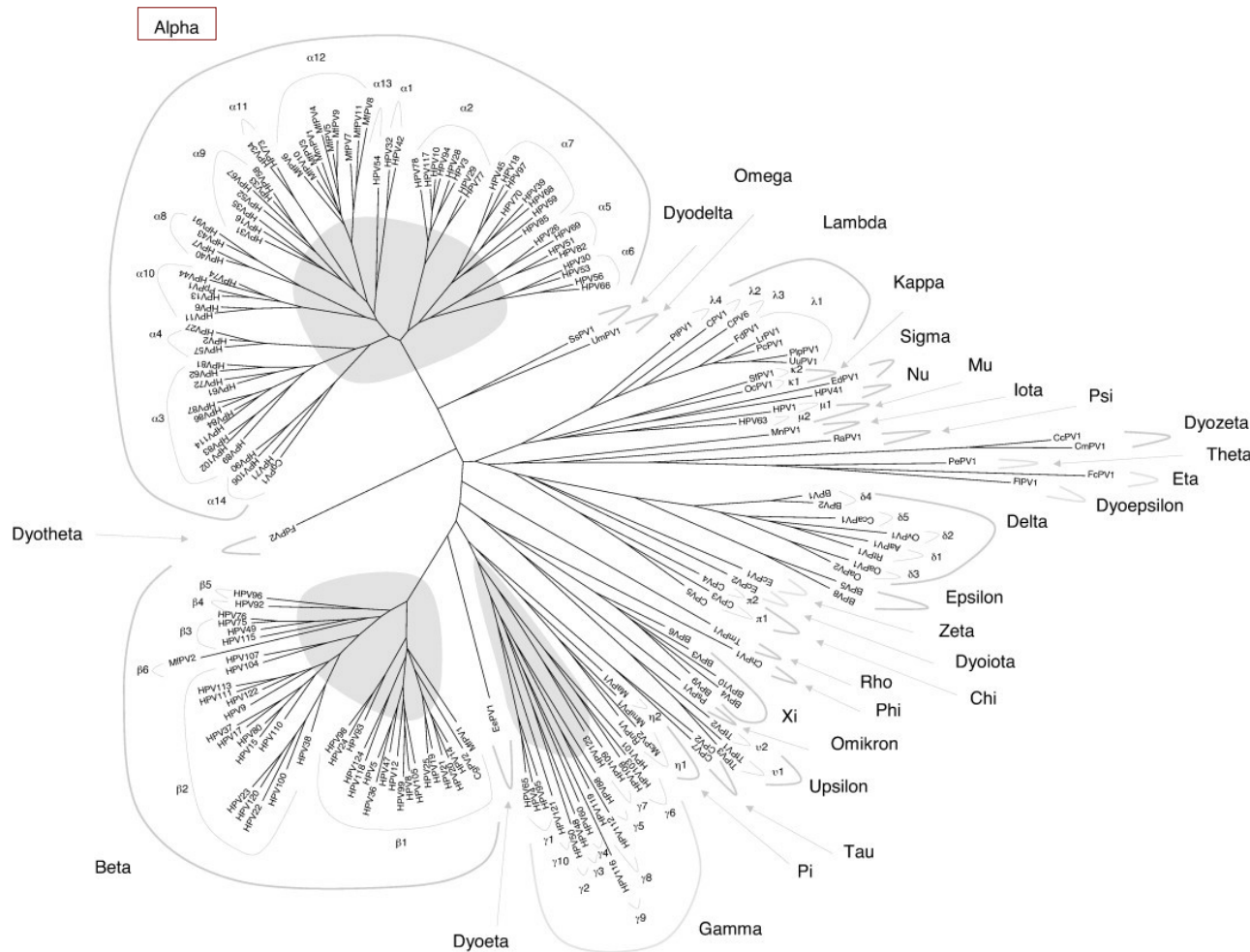


Figure 2. Classification des papillomavirus basée sur un arbre phylogénétique utilisant la ORF du gène L1 de 189 types de PV. Modifié de Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002.

Une analyse effectuée avec le génome complet des PVs par Claude Fauquet a permis de démontrer que la classification à partir du génome complet des PVs est presque identique à celle obtenue à partir de la région L1 [42]. Les PVs sont classés par plusieurs niveaux taxonomiques, soit, le genre, l'espèce, le type, le sous-type et la variante.

Les genres représentent des PVs ayant au moins 60% de similarité dans leur région L1. Les premières classifications des papillomavirus regroupaient 16 genres. Les genres étaient désignés par l'alphabet grec, allant d'alpha à pi. La dernière classification a établi 13 nouveaux genres. L'alphabet grec n'étant pas assez grand pour supporter tous les genres, les genres additionnels ont été ajoutés de façon à terminer l'alphabet grec (jusqu'à oméga). Les genres restants furent ajoutés avec le préfixe grec « dyo », qui signifie une deuxième fois. Les genres Alpha, Béta et Gamma étant les plus communs et les plus importants médicalement, les désignations Dyalpha, Dyobeta et Dyogamma furent omises. Les genres allant de Dyodelta-PVs à Dyoepsilon-PVs furent ainsi créés [33].

Les Alpha-PVs infectent les muqueuses et la peau. Ce genre contient des VPH et des PVs en mesure d'infecter des primates. Les VPH qu'il contient peuvent causer des lésions bénignes ou malignes. Les VPH capables d'engendrer un cancer sont dit VPH à haut risque (HR-VPH). Les VPH à bas risque (LR-VPH), peuvent entraîner des lésions bénignes [34]. Les HR-VPH de types 16 et 18 sont responsables de 70% des cancers du col de l'utérus. Les LR-VPH 6 et 11, aussi retrouvés dans le genre Alpha, sont responsables des 90% des lésions bénignes appelé verrues génitales ou condylomes [43]. Les autres genres ne contiennent pas de types causant fréquemment des maladies chez les humains et ne seront pas décrits en détails ici [44].

Dans un genre, on retrouve plusieurs espèces de VPH. Une espèce regroupe les Pvs ayant de 60 à 70% de similarité dans la région L1 de leur génome. Le terme espèce permet de respecter la règle de l'ICTV qui stipule qu'un virus ne peut être considéré comme une espèce que s'il a des caractéristiques biologiques distinctes. Les espèces permettent donc d'établir une distinction fonctionnelle des VPH [35]. Les différentes espèces sont désignées par un chiffre arabe. Dans une même espèce, on trouve de nombreux génotypes. La

classification selon les génotypes est la plus utilisée pour identifier les PVs. Ils sont de génotypes différents lorsque leur séquence d'ADN a plus de 10% de différence dans la ORF de leur région L1. On ajoute un chiffre pour définir le type de PVs. Par exemple, le type VPH16 est un PV infectant les humains et il s'agit du type numéro 16. Pour chaque espèce, un type de papillomavirus a été désigné. On l'appelle le type de l'espèce. Le type de l'espèce est soit le type représentant le mieux l'espèce ou le plus étudié. Par exemple, le type de l'espèce 9 est le VPH16. Ce type est le plus étudié de son espèce. Le type 67 est beaucoup moins étudié que VPH16, mais on peut s'attendre à ce qu'il ait des propriétés pathologiques et biologiques semblables à VPH16 puisqu'ils appartiennent à la même espèce [34]. Présentement, 170 types de VPH ont été acceptés [42].

Il existe une classification des VPH selon leur pouvoir oncogène (HR-VPH). Selon la classification de l'Agence internationale de recherche sur le Cancer (IARC), les agents cancérigènes sont divisés en quatre groupes. Le groupe 1 représente les cancérigènes aux humains. Le groupe 2 est subdivisé en deux. Le groupe 2A contient les agents probablement cancérigènes aux humains, et le 2B, les agents possiblement cancérigènes aux humains. Le groupe 3 comprend les agents ne se qualifiant pas comme cancérigènes aux humains. Le groupe 4, pour sa part, correspond aux agents qui ne sont probablement pas cancérigènes aux humains [45]. L'IARC classe douze types de VPH comme des agents biologiques carcinogènes de groupe (**tableau I**). Le VPH16 est le type le plus cancérigène et est en mesure d'entraîner des cancers à de nombreux sites [44].

Tableau I. Classification des VPH en fonction de leur pouvoir oncogène.

Groupe	Type de VPH	Commentaire
Genre Alpha		
1	16	Type le plus agressif, causant des cancers à de nombreux sites
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Évidences suffisantes pour le cancer du col de l'utérus
2A	68	Évidences limitées chez les humains et preuves solides mécanisme pour le cancer du col utérin
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Évidences limitées chez les humains pour le cancer du col
2B	30, 34, 69, 85, 97	Classé par analogie phylogénétique aux VPH de types avec des preuves suffisantes ou limitées chez l'humain
3	6, 11	Ne se qualifiant pas comme cancérigène chez les humains

Modifiée de Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F. Group, W. H. O. I. A. f. R. o. C. M. W. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, 10(4), 321-322. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698>

Dans un même type, on retrouve des isolats appelés sous-types ou variantes. Les sous-types ont 2 à 10% de différence dans leur région L1. Il n'existe qu'une petite quantité de sous-types et ils sont rarement utilisés pour définir les PVs. Certains sous-types ont été initialement classés comme types par erreur. Par exemple, le VPH55 était défini comme un type à part entière. Pourtant, des analyses ont démontré qu'il présente 95% d'homologie

avec le VPH44. Le VPH55 fut donc reclassé comme sous-type de VPH44 [34]. Les types connus comme possédant des sous-types sont : 5, 8, 20, 34, 44, 54, 68, 82 [18].

L'appellation variante est la plus souvent utilisée pour définir les isolats d'un même type. Les variantes ont moins de 2% de différence dans leur région L1. La région LCR détient plus de diversité intra typique que la région L1. Les variantes peuvent avoir jusqu'à 5% de différence dans leur région LCR [46]. Pour cette raison, le LCR est la région du génome viral la plus utilisée pour décrire les variantes d'un même type [18]. Pour définir une variante, on séquence généralement une région d'environ 400 pb du LCR. La région séquencée est par la suite comparée avec un génome de référence, qu'on appelle le prototype. Lorsqu'il y a une différence aussi petite qu'un nucléotide avec la variante prototypique, il s'agit d'une autre variante du type étudié [35]. Le prototype est la première variante d'un type décrit [18]. Le prototype ne représente donc pas forcément la variante la plus prévalente ou la plus ancienne [42].

Initialement, des enzymes de restriction, l'hybridation par Southern blot et les méthodes de séquençage conventionnelles permettaient de définir les différentes variantes [47]. Ces techniques étaient ardues et demandaient de longues heures de travail. Aujourd'hui, l'usage du PCR (Polymerase Chain Reaction) combiné au séquençage a permis une grande avancée dans l'identification et la classification des variantes. Les fragments partiels d'ADN de PVs séquencés portent habituellement les initiales de l'individu ou du laboratoire ayant identifié le fragment [34]. Plusieurs études effectuées sur les variantes montrent qu'il existe une quantité limitée de variantes par type. De plus, les variantes sont d'autant plus différentes quand elles sont isolées de groupes ethniques différents. Ce qui indique une évolution sur une longue période sans contact entre les différentes variantes puisque les variantes par recombinaison ne sont pas retrouvées [35].

Le génome des PVs est très stable. La fréquence d'apparition de mutations est très faible, aussi lente que celle de l'hôte [34]. Cela prend des millions d'années pour que deux PVs acquièrent 10% de différence dans leur génome [48]. Les changements génétiques des PVs adviennent par mutations ponctuelles, délétions ou insertions. Les mutations

surviennent au hasard et peuvent être établies dans une population si elles favorisent une sélection positive du mutant. La mutation peut aussi être favorisée par dérive génétique [49]. Les différents types ont été établis par sélection naturelle de certaines mutations avantageant chaque type, éliminant au fur et à mesure les intermédiaires [50]. Les mutations ayant eu lieu plus récemment sont responsables de la diversité des variantes [51].

Les variantes intra-typiques sont divisées en branches phylogénétiques obtenues à partir d'arbres phylogénétiques. Le type 16 est classé en 4 branches distinctes : Eur (Européenne-Asiatique), As-Am (Asiatique-Nord-Américaine), Af1 (Africaine 1) et Af2 (Africaine 2). La branche Eur comprend deux sous-branches : Européenne et Asiatique. La lignée européenne peut être divisée en deux : EUR-350T et EUR-350G. Le prototype de VPH16 est inclus dans la lignée EUR-350T. La branche As-Am est subdivisée en sous-branches Asiatique Américain 1 et Asiatique Américain 2 [52]. Une classification plus générale est parfois utilisée pour le VPH16 le séparant en deux groupes : la lignée Européenne versus la lignée non-Européenne [53]. Le type 18 a été subdivisé en 3 lignées : A, B et C. Les deux lignées majeures sont les lignées A et B. La lignée C est basée sur deux isolats. La lignée A est divisée en 5 sous-lignées (A1-A5) et est relativement distante des lignées B et C. La lignée A précédemment été définie comme la lignée non-africaine. La lignée B englobe la majorité des variantes africaines. La lignée B est divisée en trois sous-lignées (B1-B3). Les variantes Africain 1 font partie des sous-lignées B1 et B2. La sous-lignée B3 comprend les Africains 2 [54]. Le type 31 est divisé en trois lignées désignées par les lettres A, B et C. Le prototype de VPH31 appartient à la lignée A. La lignée C est distante des lignées A et B [55].

3. Maladies causées par les VPH

La majorité des infections par les PVs sont asymptomatiques. Une minorité entraîne des symptômes au niveau de différents épithéliums cutanés ou muqueux. Les symptômes varient en fonction des types de virus infectants et des régions affectées. Les caractéristiques spécifiques à l'hôte influencent aussi les manifestations cliniques [56].

3.1. Verrues cutanées

Des VPH cutanés peuvent entraîner des verrues vulgaires aux pieds et aux mains, communément appelées verrues plantaires ou palmaires. Les mains et les pieds sont des zones sensibles aux microlésions. Ces lésions facilitent l'entrée du virus et l'infection des cellules basales de l'épithélium [57]. Les types 1, 2 et 4 sont souvent responsables de ces verrues [58]. Les types 3, 10, 28 et 41 sont associés à des verrues planes. Ces verrues affectent majoritairement le visage, les mains ou les avant-bras des adolescents. Comme leurs noms l'indiquent, ces verrues sont plates. Elles se présentent souvent avec une coloration brunâtre [19]. Le VPH de type 7 est associé avec une affection rare, la verrue du boucher (Butcher's warts). Aucune évidence ne montre une transmission d'homme à homme pour la verrue du boucher. La manipulation de la viande semble être le facteur principal de développement de ces lésions [59].

3.2. Verrues génitales

Les verrues génitales, aussi appelées condylomes acuminés, sont causées principalement par les LR-VPH capable d'infecter les muqueuses génitales. Les types 6 et 11 causent 90% des condylomes. Les verrues génitales sont classées comme des néoplasies intraépithéliales de grade 1 [60]. Ces excroissances ont l'aspect d'un petit chou-fleur. Chez les hommes, on les retrouve sur le sillon balano-préputial, le gland du pénis et le corps du pénis, et la région anale. Les verrues génitales sont plus fréquentes chez les hommes non circoncis. Chez les femmes, les organes génitaux externes sont le plus souvent touchés. Ces lésions peuvent tout de même être retrouvées au niveau du col utérin et du vagin. Pour les deux sexes, il n'est pas rare d'observer des condylomes dans la région anale [58]. Ces verrues sont bénignes et ont des conséquences minimales sur la santé physique des individus infectés. Elles peuvent cependant avoir des conséquences psychologiques chez la personne atteinte [61].

3.3. Papillomatose respiratoire récurrente

La papillomatose respiratoire récurrente (RRP) est une condition juvénile rare, où des lésions de papillomatose se forment sur les cordes vocales. Elles peuvent entraîner des

difficultés à parler ou à respirer. Les types 6 et 11 sont les plus fréquemment associés à ces lésions [62]. Le taux d'incidence chez les enfants est d'environ 4,3 par 100 000 personnes. Il descend à 1,8 par 100 000 personnes chez les adultes [63]. Cette infection de l'épithélium respiratoire par les VPH peut être transitoire et ne nécessiter aucun traitement [64]. Malheureusement elle peut aussi être récurrente, obstruer les voies respiratoires, et nécessiter de nombreuses interventions invasives [65].

3.4. Epidermodysplasia verruciformis

L'epidermodysplasia verruciformis est une condition autosomique récessive rare, se manifestant par une susceptibilité accrue aux VPH du genre Béta (par exemple : VPH5, VPH8, VPH14, VPH15). Aussi nommée syndrome de Lutz-Lewandowsky, elle est caractérisée par la mutation des gènes EVER1 ou EVER2 [66]. Les lésions ont l'allure de verrues planes avec des macules rouge-brun se trouvant sur le visage, le cou et le corps. Les types 5 et 8 sont associés au développement de lésions malignes. On considère que la moitié des personnes touchées développeront un cancer [67]. Lorsque la personne atteinte est fortement exposée aux rayons UV, le risque de développer un cancer de la peau de type non-mélanome augmente [66]. Les cancers les plus fréquents sont des tumeurs ressemblant au carcinome de la maladie de Bowen et des carcinomes muqueux [67].

3.5. Syndrome WHIM

Le syndrome WHIM résulte d'une prédisposition génétique associée à un récepteur CXCR4 défectueux. Il est caractérisé par des verrues (**W**arts), une **H**ypogammaglobulinémie, des **I**nfections bactériennes récurrentes et une **M**yélokathexis (neutropénie congénitale). Les personnes affectées par ce syndrome sont particulièrement susceptibles aux infections aux VPH [68].

3.6. Affections pré-néoplasiques et néoplasiques

Plus de 50% des cancers féminins reliés à des infections sont causés par le VPH [69]. Chez les hommes ce chiffre diminue à 4,3% [70]. En plus de causer près de 100% des cas de cancers du col de l'utérus, certains types oncogènes sont en mesure d'engendrer des cancers à d'autres sites anatomiques. La force d'association entre le VPH et le cancer du col est très grande, dépassant même celle de la cigarette et du cancer du poumon, qui est déjà bien établie [3]. L'association entre les autres cancers et le VPH est moins forte qu'avec le cancer du col. L'ADN de VPH est retrouvé dans de nombreux cas de cancers ano-génitaux. Selon une étude, 64-91% des cancers du vagin, étaient VPH+. Ce chiffre est de 82 à 100% des cas de néoplasies intraépithéliales vaginales de grade 3. On retrouve aussi les VPH dans les cancers de la vulve et du pénis [57]. L'ADN des VPH a été retrouvé dans plus de 85% des cancers anaux. Les types 16 et 18 étaient généralement les types infectants [71]. Une zone de transformation semblable à celle du col de l'utérus se trouve au niveau de l'anus, rendant ce site susceptible aux infections aux VPH. Comme au niveau du col de l'utérus, on retrouve des HSIL et des LSIL au niveau de l'anus [24]. Les personnes immunosupprimées et les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes sont plus à risque de développer le cancer de l'anus [71].

On retrouve aussi des VPH dans certains cancers de la tête et du cou (HNSCCs). Près de 75% de ces cancers touchent les hommes [72]. Le tabagisme ainsi que la consommation d'alcool sont fortement associés au développement de ces cancers. Indépendamment du tabagisme ou de la consommation d'alcool, une augmentation du risque de développer ces cancers de près de 4 fois (95% IC 1,5–9,3) a été décrite lorsqu'il y a présence d'infection aux VPH [73]. Lorsqu'un diagnostic de cancer du col ou de cancer de l'anus a été fait, le risque de développer les HNSCCs est plus grand [74]. Le VPH de type 16 est le plus souvent associé à ces cancers. Dans les cancers de la cavité orale, certaines études rapportent que les VPH Bêtas et Gammas sont fréquemment présents [75].

Les VPH ont aussi été associés avec le carcinome de la conjonctive de l'œil. Cette tumeur rare est souvent associée à une infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) et à une exposition aux rayons UV. Les VPH cutanés de types 5 et 8 sont

les plus souvent trouvés dans ces tumeurs [76]. Des carcinomes squameux sont parfois retrouvés sur les doigts. Dans la majorité des cas, ils sont accompagnés de lésions génitales et le VPH16 est à blâmer [19]. Certaines personnes VIH+ peuvent développer des cancers muqueux aux doigts après une infection au VPH26 [77].

4. Transmission

La transmission des VPH se produit par contact direct avec friction de la peau ou des muqueuses. Les VPH de types cutanés peuvent aussi être transmis par contact avec une surface contaminée et par autoinoculation [19]. La quarantaine de types infectant la région ano-génitale sont transmis majoritairement par contact sexuel avec pénétration vaginale ou anale. Une femme n'ayant jamais eu de relation sexuelle avec pénétration n'aura à peu près jamais de VPH au niveau du col. Par contre, l'ADN de VPH a déjà été trouvé sur les organes sexuels externes de femmes n'ayant pas eu de relations sexuelles avec pénétration [78].

On estime qu'environ 80% des femmes sexuellement actives contracteront au moins une infection aux VPH entre l'âge de 20 et 79 ans [79]. Le risque d'acquisition d'au moins un VPH 3 ans après les premiers rapports est de 46% (95% IC : 28-64%) [80]. La prévalence d'infections au VPH est plus élevée chez les femmes âgées de 20 à 24 ans [81]. Un jeune âge lors des premiers rapports sexuels augmenterait le risque d'infections aux VPH. Des phénomènes comportementaux ou biologiques pourraient en être responsables. La zone de transformation du col de l'utérus, plus exposée au moment de la puberté, pourrait rendre les jeunes femmes plus susceptibles aux infections aux VPH [82]. Plusieurs caractéristiques comportementales sont associées à l'âge lors des premiers rapports, qui influence le nombre de partenaires et les comportements sexuels à risque. Une jeune fille débutant les rapports tôt tendra à avoir plus de partenaires sexuels. Le risque d'infection aux VPH augmente avec le nombre de partenaires [83]. Les infections multiples aux VPH sont aussi plus fréquentes chez les jeunes femmes [84].

La transmission se faisant principalement par contact sexuel, le comportement sexuel constitue le facteur de risque le plus important. Il y a une forte corrélation entre le nombre

de partenaires sexuels et la présence de VPH au niveau du col [85]. L'exposition à un nouveau partenaire augmente aussi le risque d'infection. On observe que le taux d'incidence des infections aux VPH est plus élevé chez les couples récemment formés [86]. La probabilité que la transmission se produise au sein d'un couple nouvellement formé est évaluée à 42% par couple (IC 95% : 36 à 47 %). Cette probabilité varie en fonction du temps, allant de 25% à moins de 2 mois jusqu'à 68% à 5-6 mois de rapports vaginaux [87].

Ainsi, pour tous groupes d'âge, la prévalence d'infection aux VPH est beaucoup plus élevée chez les travailleuses du sexe comparativement à la population générale [78]. Le risque d'infection aux VPH au col utérin ne dépend pas uniquement du comportement sexuel de la femme. Celui de l'homme joue aussi un rôle important [78]. Une étude a démontré qu'indépendamment du nombre de partenaires que des femmes mariées pouvaient avoir, la prévalence d'infection aux VPH de ces femmes augmentait avec le nombre de partenaires sexuels de leur mari [88]. L'usage adéquat et constant du condom permet d'offrir une protection partielle aux infections VPH. Cependant, le condom n'empêche pas le contact peau-à-peau avec certaines régions comme la vulve. Le risque de transmission n'est donc pas entièrement éliminé par le port du condom [89].

5. Cycle viral des VPH

5.1. Infection et zone de transformation

Le col de l'utérus constitue l'extrémité inférieure de l'utérus. Il mesure environ 4 cm et relie le vagin à l'utérus. Il est constitué de l'exocol et de l'endocol. L'exocol est la partie extérieure du col en contact avec le vagin. L'exocol est visible lors d'un examen au spéculum. Il est constitué d'un épithélium malpighien (pavimenteux stratifié) [90]. Cet épithélium possède de nombreuses couches cellulaires. Ces cellules sont rondes au niveau de la membrane basale et vont en s'aplatissant dans les couches supérieures. La membrane basale sépare les cellules basales de l'épithélium malpighien et le stroma fibromusculaire du col [82]. Seules les cellules de la couche basale ont la capacité de se diviser. Les cellules filles migrent vers la surface et créent ainsi les couches subséquentes de l'épithélium

jusqu'à leur desquamation. Après la ménopause, cet épithélium pavimenteux s'amincit [91]. L'endocol est situé à l'intérieur du col, petit canal reliant le vagin à l'intérieur de la cavité utérine. Il est composé d'une couche unicellulaire d'un épithélium glandulaire (cylindrique). Ces cellules ont une fonction sécrétoire. Une membrane basale sépare cette couche cellulaire du stroma [91].

Une infection aux VPH se produit généralement dans une région du col de l'utérus particulièrement sensible aux agents pathogènes. Il s'agit de la zone de transformation retrouvée à la frontière de l'épithélium malpighien exocervical et de l'épithélium cylindrique endocervical [92]. Continuellement, les cellules cylindriques se différencient pour devenir des cellules malpighiennes. Cette transformation se produit sous l'influence de l'acidité du milieu vaginal. Ce processus est appelé métaplasie pavimenteuse [82]. La zone de transformation change d'emplacement en fonction de l'âge de la femme et de son statut hormonal [82].

D'autres régions du corps comme l'anus et le larynx possèdent des zones de transformation similaires à celle du col de l'utérus, ce qui les rend aussi susceptibles aux cancers causés par les VPH. La zone de transformation est une zone privilégiée pour le développement d'un cancer du col de l'utérus [24].

5.2. Attachement et entrée du virus

Lors d'une infection aux VPH, le virus pénètre les kératinocytes de la lame basale, puis utilise la machinerie cellulaire de l'hôte pour compléter son cycle viral. La réplication et l'expression des gènes viraux sont intimement liées à la différenciation des cellules de l'hôte [93]. Le modèle présenté plus bas représente le cycle viral du VPH le plus étudié jusqu'à présent, le VPH16. Ce modèle peut, avec de légères modifications, être transposé aux autres types.

Pour qu'une infection aux VPH ait lieu, le virus doit parvenir aux cellules de la lame basale situées en base de l'épithélium [94]. Pour ce faire, le virus peut traverser

l'épithélium stratifié par des fissures causées par microabrasion (**figure 3**) [95]. À la zone de transformation, ces cellules de la lame basale sont plus facilement accessibles [56]. Pour les HR-VPH comme VPH16, une infection précédente ou concomitante par un autre micro-organisme peut faciliter l'entrée du virus [93]. Pour être en mesure de pénétrer dans la cellule de l'hôte, le virus doit d'abord s'y attacher grâce à un récepteur membranaire. Plusieurs études évoquent l'héparine sulfate comme récepteur utilisé par le virus [96, 97]. Il est aussi possible que la lamine 5 soit un récepteur impliqué [98]. L'attachement au récepteur engendre des changements conformationnels dans la capside virale. Ces modifications permettent le transfert du virus vers un récepteur secondaire dont la nature est encore discutée. Ce processus est nécessaire à l'internalisation du virus [56]. Le virus entreprend son entrée dans la cellule par une endocytose lente grâce à des vésicules de clathrine pour la majorité des VPH. Une minorité des VPH utilise des calvéolines pour l'endocytose [99]. L'environnement acide de l'endosome dégrade la capside virale [100]. La protéine mineure de la capside, la protéine L2, s'insère ensuite dans la membrane endosomale, provoquant son altération. Un complexe L2 et ADN viral s'échappe alors dans le cytoplasme [101]. L'ADN viral pénètre dans le noyau de l'hôte grâce à la protéine L2. La protéine L1 finit par être dégradée par les lysosomes [102].

5.3. Maintien du génome viral

Une fois dans le noyau, le VPH exploite la machinerie cellulaire de l'hôte pour effectuer la réplication de son génome [57]. Cela assure une réplication efficace avec un faible taux de mutation [103]. Dans les cellules basales, le génome viral est répliqué et maintenu à une quantité d'environ 200 copies par cellules [56]. L'ADN viral répliqué est sous forme d'épisome. Les protéines précoces (E1 à E7) sont alors exprimées en faible quantité (**figure 3**). Les protéines E1 et E2 sont essentielles à la réplication de l'ADN viral. Elles permettent de garder le génome viral sous forme d'épisome [104].

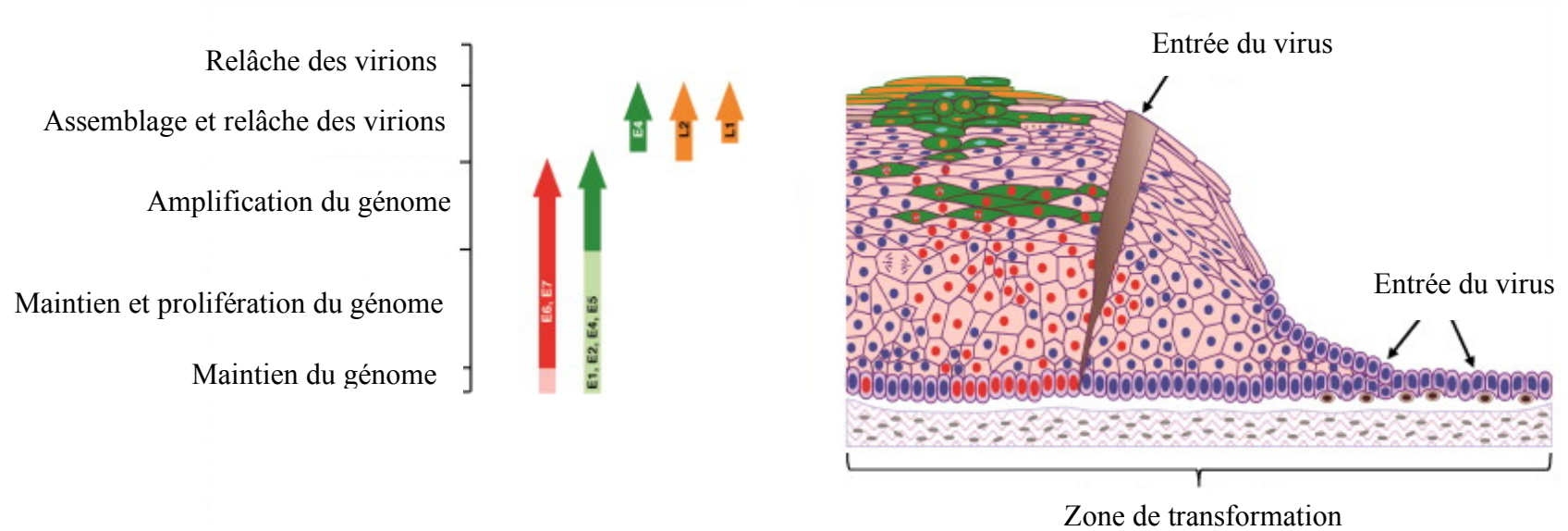


Figure 3. Cycle de vie des VPH dans un épithélium cervical. Cellules à noyau bleu : cellules normales, Cellules à noyau rouge : cellules entrant dans une phase S non planifiée, cellules vertes à noyau rouge : cellules exprimant fortement les protéines précoces et ayant la capacité de se diviser, cellules orange : cellule qui expriment les protéines de la capsid virale L1 et L2. Modifié de Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06

5.4. Phase proliférative et amplification du génome viral

Dans un épithélium cervical normal, les cellules non infectées perdent rapidement la capacité de se diviser et migrent dans les couches suprabasales pour poursuivre leur différenciation. Dans un épithélium infecté, après la phase de maintien, la phase proliférative se produit. Les protéines E6 et E7, exprimées dans les cellules basales, interfèrent avec la différenciation normale de l'épithélium [105]. En liant pRb, E7 active le facteur de transcription E2F. Ceci permet l'expression de protéines importantes à la réplication de l'ADN [106]. E6 agit sur p53, empêchant la mort cellulaire par apoptose. Le processus de différenciation normal est ainsi altéré. Les cellules peuvent alors entrer dans une phase S non programmée [106]. Les HR-VPH ont une meilleure capacité à faire entrer les cellules dans cette phase S. En effet, les LR-VPH ont une affinité plus faible avec certaines protéines cellulaires, dont celle du rétinoblastome et p53 [30]. Durant cette phase proliférative, le nombre de copies d'ADN viral augmente. La quantité de protéines E2 augmentant, elles inhibent les gènes E6 et E7. Les cellules entament alors dans une phase de différenciation tout en progressant vers les couches superficielles. Les gènes viraux sont fortement exprimés. Les promoteurs tardifs sont activés, entraînant la transcription des gènes L1, L2 [107].

5.5. Encapsidation et relâche

La fin du cycle viral est caractérisée par l'encapsidation de l'ADN viral et la relâche de virions matures. Les protéines L2 sont recrutées aux régions où se déroule la réplication grâce à la protéine E2. Dans les couches superficielles, où se trouvent les cellules prêtes à être desquamées, l'environnement est oxydant. Cet environnement favorise les liens entre les protéines L1 [108]. La capside icosaédrique est ainsi formée et l'ADN viral y est encapsidé. Les virions matures sont ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire par desquamation. La protéine E4 semble impliquée dans la relâche du virus en détruisant les filaments intracellulaires et en engendrant la libération de virions sans causer de réaction inflammatoire [24].

6. Histoire naturelle des maladies pré-néoplasiques et néoplasiques du col

Après une infection aiguë aux VPH, plusieurs scénarios sont possibles. Une infection productive peut résulter d'un contact avec un VPH. Il y a alors une production de virions matures et leur relâche dans le milieu extracellulaire [56]. Des cellules caractéristiques de ce type d'infection sont des koilocytes. Ces cellules ont un noyau déformé, un cytoplasme vide ainsi qu'une membrane cytoplasmique épaisse. Cette morphologie témoigne de la grande réplication se déroulant dans les cellules de l'hôte [7].

Les infections transformantes surviennent uniquement en présence de HR-VPH. Ces infections sont une cause nécessaire mais non suffisante au développement d'un cancer du col utérin. Un cancer du col utérin peut se présenter sous plusieurs formes. Dans la majorité des cas, ils sont des carcinomes épidermoïdes malpighiens (90%) et, dans des cas moins fréquents (10%), des adénocarcinomes du col [5]. Essentiellement, pour développer des lésions précancéreuses, il faut avoir une infection persistante à au moins un VPH oncogène. Ces lésions, lorsque non traitées, peuvent progresser vers un cancer invasif (**figure 4**) [109].

La persistance de l'infection par un HR-VPH est un facteur déterminant de développement de lésions précancéreuses [6]. L'infection persistante peut résulter d'une infection productive initiale, avec ou sans une phase de latence puis d'une résurgence de l'infection productive, qui n'est pas éliminée par le système immunitaire. [95]. La persistance est liée à un échappement du système immunitaire [110]. La moitié des infections aux VPH sont éradiquée après 6 à 12 mois [111]. Seule une minorité des infections persistent plus de 24 mois. La capacité de persister varie selon le type de VPH. Les infections aux VPH16 et 18 persistent plus que les infections aux autres types [95]. La probabilité de l'intégration du génome viral à celui de l'hôte est augmentée par la persistance de l'infection. Lors de l'intégration, le gène E2 est clivé. Il perd sa capacité à inhiber les protéines E6 et E7. Ces oncoprotéines sont donc surexprimées [6]. Comme mentionné plus tôt, elles entraînent une instabilité chromosomique et favorisent le

développement des divisions cellulaires non planifiées [57], ce qui entraîne une accumulation d'anomalies génomiques humaines. Plus il y a d'anomalies, plus les cellules sont anormales et le grade des lésions est élevé. Les lésions précancéreuses du col sont classées selon leur grade. Différentes classifications ont été proposées pour définir les lésions causées par les infections aux VPH. On retrouve principalement deux méthodes de classifications différentes, toutes deux basées sur l'épaisseur atteinte de l'épithélium.

Le terme dysplasie est un terme général désignant une atypie épithéliale du col. Une première classification histologique sépare les lésions en trois catégories; les néoplasies cervicales intraépithéliales de grade 1, 2 et 3 (CIN1, CIN2 et CIN3) [112]. Une classification à 2 niveaux (bas grade LSIL et haut grade HSIL) a récemment fait l'objet d'un consensus international [113]. Elle se rapproche de la classification proposée pour les cytologies, la classification de Bethesda. Les LSIL incluent les infections aux VPH et les CIN1. Les HSIL comprennent les CIN2 et CIN3 (**figure 4**). Le terme de carcinome in situ (CIS) désigne les lésions dans lesquelles les changements cellulaires affectent toute l'épaisseur de l'épithélium sans rupture de la membrane basale. Lorsque les cellules traversent la membrane basale, la lésion est au stade de cancer invasif du col [114].

Les LSIL peuvent être causées par une infection productive à tous les types de VPH capables d'infecter le col de l'utérus. Ces lésions arborent des anomalies mineures. La majorité des CIN1 régresse ou reste au stade d'infection. Les cellules ont une bonne différenciation, sont polyploïdes ou diploïdes. Au maximum le tiers inférieur de l'épithélium est désorganisé. On observe des koilocytes dans les couches superficielles avec un peu d'anomalies dans les couches basales. Les HSIL sont causées par les VPH oncogènes. Les cellules retrouvées dans ces lésions sont aneuploïdes. Dans les CIN2, la moitié ou les deux-tiers de l'épithélium est désorganisé. Dans une CIN3, plus du deux-tiers de l'épithélium est désorganisé. [95].

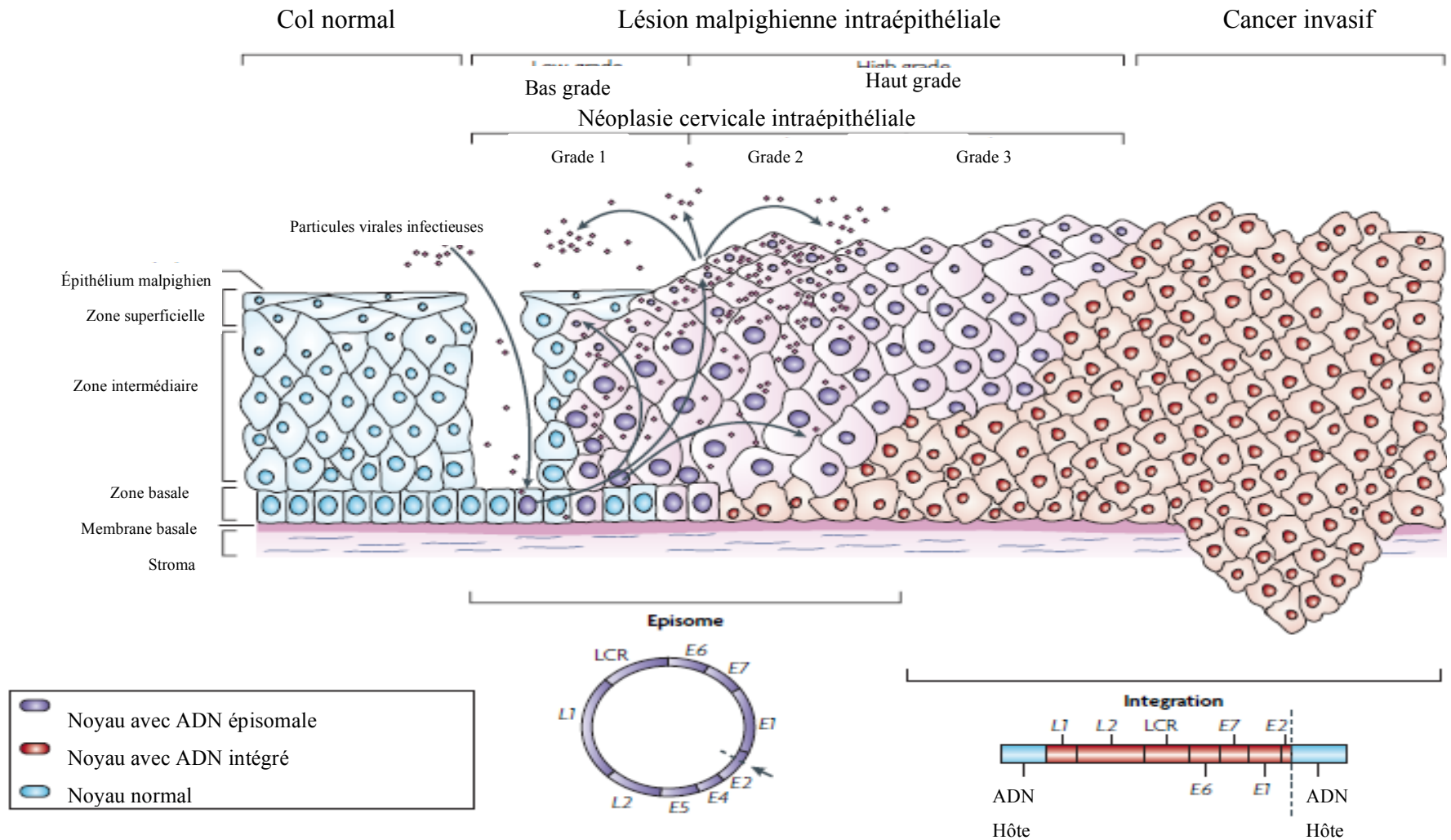


Figure 4. Histoire naturelle de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Cellules bleues : Épithélium normal, cellules mauves : cellules infectées avec génome viral sous forme d'épisome, cellules rouges : cellules infectées avec génome viral sous forme intégrée. Modifié de Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical VPH infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7(1), 11-22. doi:10.1038/nrc205

L'estimation du risque réel de progression des lésions précancéreuses vers le cancer du col représente un défi de taille. D'une part, le diagnostic de CIN1 et surtout celui de CIN2 n'est pas 100% reproductible, celui de CIN2 étant le moins reproductible de tous [115]. Les conclusions de changements de grade (de CIN1 vers CIN2 par exemple) sont donc difficiles à faire puisqu'elles n'indiquent pas nécessairement une progression. De plus, en traitant les lésions précancéreuses ou même en effectuant une biopsie diagnostique, l'histoire naturelle de la lésion est altérée. Cette altération peut provenir de l'activation du système immunitaire au site de biopsie, ce qui pourrait augmenter la probabilité d'une régression. Il devient alors impossible de savoir quelle proportion réelle de lésions aurait progressé vers le cancer. On pourrait donc penser que les estimés décrits dans la littérature sont en réalité des sous-estimés du risque réel. Moscicki et al. ont résumé les données disponibles et on peut retenir que : (1) le taux de régression des CIN varie selon la gravité des lésions. Les CIN1 ont le plus haut taux de régression. Il est évalué à près de 60%-80% en 2 ans. (2) Il est estimé que moins de 10% des CIN1 progresseront vers un CIN3. (3) Les lésions CIN2 ont 30-70% de chance de régression en 2 ans [116].

Les CIN3 sont considérées comme les réels précurseurs de cancer du col. Elles représentent le meilleur biomarqueur histologique du risque d'un cancer du col de l'utérus [117]. L'analyse d'une situation malheureuse a permis d'en apprendre davantage sur la progression des CIN3. Entre 1955 et 1976, un colposcopiste a remis en doute la nature précancéreuse des CIN3 et a omis de traiter ses patientes. Une fois la situation mise au jour, une analyse rétrospective a permis de déterminer que 31% (95% CI : 22,7 % – 42,3 %) des femmes diagnostiquées avec un CIN3 et ne recevant pas de traitement adéquat développent un cancer du col après 30 ans. En tenant compte que les prélèvements effectués pour les diagnostics pourraient diminuer le risque de progression, ce chiffre représente probablement une sous-estimation du risque réel [118]. De nombreuses années sont nécessaires pour que la carcinogénèse soit complétée. Plusieurs facteurs influencent les étapes de la carcinogénèse. Chaque étape est intimement liée aux caractéristiques de l'hôte et à celles du virus l'infectant [57].

7. Facteurs de risque de développement du cancer du col de l'utérus

7.1. Facteurs viraux

7.1.1. Types

Comme expliqué plus tôt, les types de VPH oncogènes sont en mesure d'engendrer le cancer du col utérin. Dans de rare cas, surtout les cas d'immunosuppression, on peut observer le développement de cancer avec des types de bas risque [119]. En ordre décroissant, les types oncogènes les plus fréquemment trouvés dans les cancers sont VPH16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 et 35. Ils sont responsables de 90% des cancers du col de l'utérus [120].

Tous les HR-VPH n'ont cependant pas le même pouvoir oncogène [44]. À lui seul, le VPH16 est responsable de plus de 50% des cancers du col de l'utérus [121]. On retrouve significativement plus le VPH16 dans les carcinomes malpighiens que dans les adénocarcinomes [120]. Le VPH16 entraîne plus fréquemment que les autres génotype des infections persistantes. Certains auteurs ont suggéré que VPH16 aurait un mécanisme particulier qui lui permettrait d'échapper au système immunitaire [6]. L'ADN viral trouvé dans les lésions cancéreuses VPH16+ peut être trouvé sous forme épisomale et/ou sous forme intégrée au génome de l'hôte [122]. De façon générale, plus la sévérité de la néoplasie est élevée, plus VPH16 est retrouvé sous forme intégrée. Cependant, dans certains cas de cancer invasifs on retrouve VPH16 uniquement sous forme épisomale [95].

Le VPH18 est responsable pour sa part d'environ 15% des cancers du col de l'utérus [121]. VPH18 est fréquemment détecté dans les adénocarcinomes [123]. Les cancers causés par VPH18 ont de façon générale un pronostic plus mauvais que ceux causés par le type 16 [124, 125]. La durée des infections causées par VPH18 est plus élevée que celles causées par VPH16 : elles sont éliminées en moyenne après 17 mois [95] tandis que les infections causées par VPH16 sont éliminées en moyenne après 12 mois [126].

7.1.2. Infections multiples

Les infections multiples aux VPH pourraient jouer un rôle dans la gravité des lésions. Une étude a décrit une augmentation du risque de développer des LSIL avec l'augmentation du nombre de types infectants l'hôte [127]. Les infections par plusieurs types de VPH sont fréquentes. Elles peuvent résulter d'une transmission par un partenaire infecté par plusieurs types ou de plusieurs épisodes de transmission. Elles sont trouvées plus fréquemment chez les jeunes femmes et les femmes ayant une cytologie anormale [84]. Les femmes immunosupprimées sont plus sujettes aux infections multiples [128].

7.1.3. Charge virale

L'association entre la charge virale et la gravité des néoplasies est complexe. Certaines études ont conclu que la charge virale est proportionnelle à la sévérité de la maladie, tandis que d'autres n'ont trouvé aucune association ou encore une relation inversement proportionnelle (charge virale plus grande dans les LSIL) [95].

Le type infectant, l'état du génome viral ainsi que la lésion sont des facteurs pouvant modifier considérablement la charge virale [95]. On pourrait s'attendre à ce qu'une charge virale soit faible lors d'une infection latente ou d'une forte intégration du génome viral sans production de virions. Présentement, la charge virale n'est pas considérée comme un bon prédicteur du risque de développer des HSIL [129].

Plusieurs études sont en faveur du fait qu'une charge virale élevée, mesurée à partir de spécimens d'écouvillonnages cervicaux, chez des femmes infectées de façon persistante par VPH16 soit associée à une progression de lésions cervicales. Une étude démontre que le risque de développer des CIN3 augmente avec une charge virale élevée lorsqu'on compare des femmes VPH16+ (OR : 1,63 95% IC 1,33–1,99 par 1 log₁₀ unité d'augmentation de charge virale). Les femmes ayant une charge virale plus faible développent moins de CIN3 [130]. Plusieurs études ont associé la charge virale de VPH16 avec la sévérité de la maladie [131, 132]. Une autre étude vint à la conclusion que la charge virale est inversement liée à l'éradication de l'infection pour

VPH16. Plus la charge virale est élevée plus l'infection à VPH16 est persistante [133]. Dans le même ordre d'idée, une charge virale pour VPH16 supérieure à 22 000 copies par 10^3 cellules a été associée à une tendance à progresser vers des HSIL ou lésions invasives [134]. La charge virale de VPH16 est particulièrement élevée pour des femmes VIH+ dans des HSIL et lésions invasives [135]. La charge virale du type 18 pourrait aussi être associée à une plus grande sévérité des lésions cervicales [132].

7.2. Facteur de l'hôte

7.2.1. Prédisposition génétique

Une certaine prédisposition génétique favorise la progression vers le cancer du col de l'utérus. Elle a cependant un effet mineur. Un polymorphisme au niveau des antigènes HLA de classe I et II, de Tap 1, Tap 2 ainsi que de KIR (killer immunoglobine-like receptor) pourrait favoriser le développement de LSIL [110]. Plusieurs haplotypes de HLA ont été significativement associés à une augmentation du risque de progresser vers un cancer du col lorsque l'infection initiale était par le type VPH16 [136]. Chez des personnes ayant des prédispositions génétiques, certaines lésions bénignes ne comportant pas de risque majeur pour la population générale peuvent avoir des répercussions graves [66].

7.2.2. Statut immunitaire

Les individus immunosupprimés ont une capacité réduite à éradiquer les infections aux VPH. Ils sont donc plus susceptibles au développement de lésions cancéreuses. Les personnes infectées par le VIH et les individus transplantés sont donc plus à risque de progresser vers le cancer [110]. La population séropositive a un risque plus élevé de développer des cancers invasifs reliés aux infections aux VPH. Les femmes séropositives sont plus touchées par les types 18, 33, 51, 52, 53, 58 et 61 [137]. Pour le cancer du col de l'utérus, le risque est 5 fois plus élevé chez ces femmes. Chez les VIH+, le risque est aussi augmenté pour les cancers de la vulve, du vagin, du pénis et de l'anus. Les hommes séropositifs ont 37,9 fois (IC 95% : 33,0 – 43,4) plus de risque de développer un cancer anal [138]. Les transplantés ont aussi un risque accru

pour le cancer du col, du pénis, de l'anus, de la vulve et du vagin. Cependant, une femme transplantée a une augmentation de risque plus grande pour le cancer de la vulve et du vagin comparativement à une femme séropositive [139].

7.2.3. Parité

Le nombre de grossesses menées à terme est associé à une légère augmentation du risque de développer un cancer du col de l'utérus (RR : 1,1, IC 95% : 1,08-1,12) [57]. Une étude a démontré que l'accouchement augmente le risque de développer des lésions de haut grade chez des femmes ayant des infections persistantes à un VPH à haut risque (HR-VPH : 1.78; 95% IC : 1.07-2.94) [140]. La réponse immunitaire diminuée et la haute concentration en hormones durant la grossesse pourraient aussi expliquer l'augmentation du risque lié à la parité [141]. De plus, la zone de transformation est plus exposée lors des grossesses, ce qui pourrait contribuer à augmenter le risque de développer des lésions précancéreuses et des cancers invasifs du col [57].

7.3. Facteurs environnementaux

7.3.1. Tabagisme

Il est reconnu que le tabagisme augmente le risque de cancer du col de l'utérus. Les fumeurs actuels, fumant plus de 15 cigarettes par jour, ont environ deux fois plus de chance de développer un carcinome malpighien du col utérin [57]. Il y a une augmentation significative du risque pour les fumeurs actuel (RR = 1,60 (95% CI: 1,48-1,73), $p < 0,001$) lorsque comparés aux personnes n'ayant jamais fumé. Le risque est un peu moins accru chez les anciens fumeurs (RR = 1,12 (1,01-1,25)). Le jeune âge lors du début de la consommation de cigarette est aussi associé au risque de développer un carcinome malpighien. Le tabagisme n'est pas statistiquement associé au risque de développer des adénocarcinomes du col utérin [141]. Il a été démontré que le tabagisme réduit les chances de régression des LSIL [142]. Le tabagisme diminue la réponse immunitaire au niveau du col de l'utérus. Des études indiquent que le tabagisme diminuerait la capacité à éliminer les infections aux VPH, facilitant la persistance [143, 144].

7.3.2. Contraceptifs oraux

Un usage prolongé de contraceptifs oraux est associé à une augmentation du risque de progression vers le cancer du col de l'utérus. Un usage inférieur à 4 ans n'est pas associé à une augmentation du risque [145]. Une étude multicentrique conduite par l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a trouvé une augmentation de 4 fois (2,09–8,02) du risque de développement de cancer pour un usage de plus de 10 ans [146]. Une diminution du risque a aussi été associée avec la cessation d'utilisation de contraceptifs oraux [147]. Le risque observé avec la consommation de contraceptifs oraux pourrait cependant être dû à des biais. Par exemple, les femmes faisant usage de contraceptifs ont des examens gynécologiques plus fréquents. Ceci pourrait entraîner un biais de détection. En effet, les chances de détecter des lésions précancéreuses et des cancers chez ces femmes sont augmentées par la fréquence accrue des examens diagnostics. Aussi, l'usage de contraceptif oraux est associée au comportements sexuels ce qui pourrait aussi entraîner un biais [3]. Le mécanisme par lequel l'usage de contraceptifs oraux augmenterait le risque de progression vers des lésions cancéreuses pourrait reposer sur le fait que l'œstrogène et ses dérivés sont capables d'activer une région promotrice des VPH. Ceci a pour effet de favoriser l'immortalisation des cellules infectées et par conséquent le risque de développer des lésions malignes [148]. Malheureusement, les résultats rapportés ci-haut ne font pas la différence entre les différents types de contraceptifs oraux (contraceptifs oraux combinés ou les contraceptif progestatifs). Cependant, trois autres études ont conclu que l'usage de contraceptifs progestatifs injectables n'augmente pas le risque de cancer du col [149]. De plus, des études se basant sur des résultats obtenus à partir de souris transgéniques démontrent que l'œstrogène augmente le risque de cancer du col utérin tandis que la progestérone inhiberait la carcinogénèse [150, 151]. La progestérone se lierait à son récepteur et inhiberait la prolifération cellulaire des cellules épithéliale du col [150].

7.3.3. Présence d'autres infections transmissibles sexuellement

La présence d'autres infections transmissibles sexuellement (ITS) peut influencer la progression d'une infection par VPH vers le cancer du col de l'utérus. Les agents infectieux favorisant le développement du cancer du col sont le VIH et le *Chlamydia trachomatis* (CT)

[57]. CT entraîne une inflammation au niveau du col de l'utérus. Cette inflammation a pour conséquence la formation de radicaux libres qui peuvent léser le col et favoriser la progression vers des lésions cancéreuses [152]. Pour sa part, le VIH entraîne une immunosuppression qui favorise la progression vers un cancer du col [153].

8. Prévention du cancer du col de l'utérus

Le stade préinvasif du cancer du col peut durer de nombreuses années. Ce temps permet le dépistage et le traitement des lésions pré-invasives [154]. L'efficacité du dépistage et du traitement fait en sorte, qu'aujourd'hui, l'absence de dépistage ou le dépistage inadéquat représente le facteur de risque le plus important pour la progression de lésions précancéreuses vers le cancer du col [155].

La vaccination contre certains types de VPH est possible depuis une dizaine d'années. Trois vaccins anti-VPH sont disponibles au Canada. Le vaccin Cervarix (GlaxoSmithKline Biologicals) cible les types 16 et 18. Le vaccin Gardasil (Merck & Co., Inc) protège contre 4 types de VPH, soient les types 6, 11, 16 et 18 [156]. Le Gardasil 9 (Merck & CO., Inc.) cible 9 types : 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 et 58 [157]. La vaccination anti-VPH semble extrêmement efficace, au niveau populationnel, pour prévenir les infections et les lésions associées aux VPH [158]. Par exemple une méta-analyse conclue que l'efficacité des vaccins ciblant les types 6, 11, 16 et 18 contre les CIN1 est de 95 % (IC 95% : 88%-98%). L'efficacité est de 97 % (IC 95% : 85%-99%) pour les CIN2 et de 95 % (IC 95% : 78%-99%) pour les CIN3 [159].

8.1. Pap test

Le test Pap tient son nom du Dr. George Papanicolaou qui, avec ses collaborateurs, a découvert que des cellules précancéreuses et cancéreuses pouvaient être détectées par la cytologie. Il permet d'observer les changements cellulaires se produisant dans l'épithélium du col. Il existe deux méthodes de frottis cervical : le frottis conventionnel et le frottis en milieu liquide. Lors d'un test Pap, le professionnel de la santé place la patiente en position gynécologique et il insère un spéculum à l'intérieur du vagin. Avec un écouvillon, il effectue un prélèvement au niveau du col de l'utérus. Pour le frottis conventionnel, les cellules prélevées

sont par la suite déposées sur une lame pour examen. Pour un frottis en milieu liquide, les cellules sont d'abord dispersées dans un liquide de transport. Par la suite, elles sont mises sur une lame en couches minces puis fixées pour être observées [160]. La classification de Bethesda permet de classer les résultats obtenus.

La classification de Bethesda a été établie pour promouvoir une communication efficace des résultats cytologiques des laboratoires aux cliniciens. Elle permet de standardiser les rapports de laboratoire [161]. La dernière version de cette classification fut établie en 2014, lors d'un atelier regroupant un panel de spécialistes incluant des cytopathologistes, des épidémiologistes et des cliniciens. Il est important de noter que le test cytologique est un test de dépistage et qu'il n'établit pas un diagnostic final [162].

Le type de prélèvement effectué, soit frottis traditionnel ou en milieu liquide, est spécifié dans ces rapports. Ces rapports incluent aussi une évaluation de la qualité du spécimen. Un prélèvement peut être trouvé satisfaisant ou insatisfaisant pour l'évaluation. La mention satisfaisant est accompagnée d'une description des éléments de la zone de transformation ou d'éléments glandulaires cervicaux. Pour que le spécimen soit satisfaisant, une cellularité épidermoïde minimale est requise (8 000 - 12 000 cellules squameuses bien visibles pour un test Pap conventionnel et 5 000 cellules squameuses pour un test Pap en milieu liquide). Un minimum de 10 cellules métaplasiques doivent être observées pour être en mesure de confirmer la présence d'une zone de transformation. Des indicateurs de la qualité des spécimens sont aussi utilisés pour compléter la mention satisfaisant. Lorsque de la moitié au trois quarts de l'épithélium n'est pas visible, on dit que le spécimen est partiellement obscurci. Quand plus du trois quarts de l'épithélium est obscurci, le spécimen est non satisfaisant [163]. Un spécimen non identifié ou mal identifié peut être rejeté avant d'être traité. Il peut aussi l'être après avoir été traité puis jugé inadéquat [160].

Les résultats sont catégorisés de façon générale dans des catégories mutuellement exclusives : négatif pour une lésion intraépithéliale ou maligne, présence d'anomalies des cellules épithéliales ou autre (**tableau II**).

Le spécimen est négatif pour une lésion intraépithéliale quand aucune anormalité épithéliale n'est décelée. Cette catégorie regroupe cependant des affections non-néoplasiques telles que des infections bactériennes [161]. Lorsqu'une anomalie épithéliale cellulaire est observée, elle peut être de nature malpighienne ou glandulaire. On utilise le terme « cellules épithéliales atypiques » quand la distinction malpighienne versus glandulaire ne peut être faite.

Tableau II. Classification de Bethesda 2014

TYPE DE SPÉCIMEN :

Le frottis conventionnel vs le frottis en milieu liquide vs autre

QUALITÉ DU SPÉCIMEN :

- Satisfaisant pour évaluation (*décrire le spécimen; présence ou absence de zone de transformation, d'indicateurs de qualité du spécimen etc.*)
- Insatisfaisant pour évaluation... (*spécifier la raison*)
 - Spécimen rejeté / non traité (*spécifier la raison*)
 - Spécimen traité et examiné, mais insatisfaisant pour l'évaluation des anomalies (*spécifier la raison*)

CATÉGORISATION GÉNÉRALE (optionnel) :

- Négatif pour les lésions intraépithéliales ou malignes
- Autres : voir section Interprétation/Résultat (*ex : cellules endométriales présentes chez une femme de plus de 45 ans*)
- Anomalies épithéliales cellulaires : voir section Interprétation/Résultat (*spécifier s'il s'agit de changements «malpighiens» ou «glandulaires»*)

INTERPRÉTATION/ RÉSULTAT

NÉGATIF POUR LES LÉSIONS INTRAÉPITHÉLIALES OU MALIGNES :

(Lorsqu'il n'y a pas d'évidence de néoplasie, il faut noter dans la section Catégorisation générale ou dans la section Interprétation/résultat s'il y a présence d'un organisme ou d'une modification non néoplasique)

Changements non-néoplasiques (optionnel)

- **Variations cellulaires non-néoplasiques**
 - Métaplasie malpighienne
 - Changements kératosiques
 - Métaplasie tubaire
 - Atrophie
 - Changements associés à la grossesse
- **Changements réactifs associés à :**
 - Inflammation (incluant la réparation typique)
 - Radiation
 - Dispositif contraceptif intra-utérin
- **Statut des cellules glandulaire post hystérectomie**

Présence d'organismes

- *Trichomonas vaginalis*
- Organisme fongique morphologiquement consistant avec *Candida* spp.
- Changement de la flore vaginale suggérant une vaginose bactérienne
- Bactéries morphologiquement consistantes avec *Actinomyces* spp.
- Changements cellulaires consistants avec le virus Herpès simplex (HSV)
- Changements cellulaires consistants avec le cytomegalovirus (CMV)

AUTRES :

Cellules endométriales (chez une femme de ≥ 45 ans)

(Spécifier si "négatif pour lésions squameuses intraépithéliales")

ANOMALIES ÉPITHÉLIALES CELLULAIRES :

Anomalies malpighiennes :

- **Atypie des cellules épithéliales (ASC)**
 - Indéterminée (ASC-US)
 - Ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne de haut grade (ASC-H)
- **Lésions malpighiennes intraépithéliales de bas grade (LSIL)**
(englobe : infection aux VPH, dysplasie légère, CIN1)
- **Lésions malpighiennes intraépithéliales de haut grade (HSIL)**
(englobe : dysplasie modérée ou sévère, CIS, CIN2 et CIN3)
 - Avec des caractéristiques permettant de suspecter l'invasion (le cas échéant)
- **Carcinome malpighien**

Anomalies glandulaires :

- **Atypies**
 - Endocervicales (ou sans autre indication)
 - Endométriales (ou sans autre indication)
 - Glandulaire (ou sans autre indication)
- **Atypies**
 - Endocervicales en faveur d'une néoplasie
 - Glandulaire en faveur d'une néoplasie
- **Adénocarcinome endocervical in situ (AIS)**
- **Adénocarcinome**
 - Endocervical
 - Endométrial
 - Extra-utérin
 - Sans autre indication

AUTRES TUMEURS MALIGNES : (spécifier)

TESTS AUXILLIAIRES :

Donne une brève description des méthodes de tests et un rapport des résultats obtenus de façon à ce que le clinicien puisse facilement le comprendre.

INTERPRÉTATION DE LA CYTOLOGIE CERVICALE À L'AIDE D'UN ORDINATEUR :

Si le cas a été examiné par un appareil automatisé, spécifier l'appareil ainsi que le résultat obtenu.

NOTES À TITRE ÉDUCATIF ET COMMENTAIRES ANNEXÉS AU RAPPORT CYTOLOGIQUE (optionnel)

Les suggestions doivent être concises et consistantes avec les recommandations de suivi publiées par des organisations professionnelles (référé aux ouvrages pertinents)

Modifié de Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain). *Acta Cytol*, 59(2), 121-132. doi:10.1159/000381842. The article/book chapter printed herein has been translated into french from the original by RifhtsLink. KARGER PUBLISHERS CANNOT BE HELD RESPONSIBLE FOR ANY ERRORS OR INACCURACIES THAT MAY HAVE OCCURRED DURING TRANSLATION. THIS ARTICLE/BOOK CHAPTER IS COPYRIGHT PROTECTED AND ANY FURTHER DISTRIBUTION REQUIRES A WRITTEN CONSENT FROM KARGER PUBLISHERS.

La catégorie « autre » inclut la présence de cellules endométriales chez les femmes de 45 ans et plus [161]. Ces cellules pourraient révéler des anomalies endométriales [164].

La catégorie des anomalies malpighiennes contient (a) les cellules squameuses atypiques (ASC), (b) les LSIL, (c) les HSIL et (d) le carcinome malpighien. Les cellules squameuses atypiques regroupent des modifications mineures pouvant être de signification indéterminée (ASC-US) ou ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intraépithéliale de haut grade (ASC-H) [7].

Les cellules glandulaires atypiques regroupent (a) les atypies endocervicales, endométriales ou glandulaires, (b) les atypies des cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie, soit endocervicale ou glandulaire (c) les adénocarcinomes endocervicaux in situ (AIS) et (d) les adénocarcinomes [161]. Environ 10 à 39% des femmes présentant des atypies glandulaires auront un diagnostic de HSIL lors du suivi médical [165, 166]. Les adénocarcinomes endocervicaux in situ (AIS) et les adénocarcinomes ont de grandes similarités morphologiques [163]. L'adénocarcinome in situ est l'étape préinvasive de l'adénocarcinome, une tumeur maligne prenant son origine des cellules glandulaires [95]. L'adénocarcinome peut être classé comme endocervical, endométrial, extra-utérin ou non spécifié.

La classification de Bethesda prévoit aussi une catégorie pour les autres néoplasies malignes décelées. Elle inclut aussi des sections pour les tests supplémentaires effectués et leur résultat. Aussi, les résultats obtenus grâce à un ordinateur doivent être rapportés dans une section séparée. Cette section inclut la machine utilisée et les résultats obtenus grâce à cette dernière. Une section est prévue pour annexer les notes ainsi que les commentaires du rapport cytologique [161].

Les paramètres recommandés de dépistages varient d'une province/territoire à l'autre. En général au Canada, le dépistage est recommandé entre 21-25 ans et 65-69 ans, à chaque 2-3 ans [167]. L'introduction du test Pap dans les années 60 a grandement contribué à la diminution du taux d'incidence du cancer du col de l'utérus au Canada [155]. Plus spécifiquement, le

dépistage a permis de diminuer l'incidence des carcinomes squameux. Elle eut peu d'influence sur celle des adénocarcinomes [95]. Le taux d'incidence de carcinomes squameux a diminué de 11.1 par 100 000 personnes en 1970-1972 à 5.3 en 1994-1996 [155]. Le risque de développer un cancer du col est de 3 à 10 fois plus grand chez des femmes n'ayant jamais été dépistées. Un dépistage inadéquat c'est-à-dire peu fréquent ou avec un intervalle de temps trop grand, augmente le risque [168, 169]. L'objectif principal du test Pap est de détecter les lésions précancéreuses pour permettre leur traitement. Bien que la classification de Bethesda permette de normaliser les résultats par cytologie, ils sont tout de même assez subjectifs [160]. Le test Pap conventionnel a une proportion de faux-positif allant de 14 à 33%. Et des faux-négatifs adviennent dans 1,5 à 25% des cas [170]. Un dépistage fréquent par test Pap augmente le nombre de traitement effectué pour des LSIL (non précancéreuses). Ces traitements ont un impact sur les grossesses futures. Il a été démontré que ces conséquences sont plus importantes chez les jeunes femmes [154].

8.2. Test VPH

En 2014, la FDA a approuvé le premier test VPH pouvant être utilisé seul pour le dépistage primaire du cancer du col utérin: le cobas® VPH Test de Roche Molecular Diagnostics. Le test permet de détecter 14 types de VPH oncogènes; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68 [171]. Le test indique la présence séparément des types 16 et 18, alors que la présence des 12 autres génotypes est regroupée en un seul groupe (12 HR autres que 16 et 18). Lorsque le résultat du test pour une femme s'avère positif pour les types 16 ou 18, elle devrait être dirigée au diagnostic par colposcopie. Si elle a un résultat positif pour le groupe des 12 autres types, elle devrait être orientée au test Pap. Les résultats du test Pap détermineront alors le besoin de subir une colposcopie [172]. Ce type de dépistage est peu pratiqué au Canada, puisque non remboursé par le régime public. Certaines provinces canadiennes (Alberta, Québec et Territoires du Nord-Ouest) recommandent l'usage du test VPH dans le dépistage du cancer du col [173]. Le Québec, par exemple, recommande l'utilisation du test VPH pour les femmes de plus de 30 ans obtenant un résultat ASC-US à la cytologie. Si le test VPH démontre la présence de HR-VPH, ces femmes sont dirigées en colposcopie. Au

contraire, si le test démontre l'absence de HR-VPH, ces femmes subissent une cytologie l'année suivante [174].

Le test Hybrid Capture 2 (HC2) a été approuvé en 2003 par la FDA pour une utilisation conjointe avec le test Pap pour le dépistage et pour le tri des femmes avec une cytologie ASC-US. Ce test permet de détecter la présence de HR-VPH sans distinguer le type spécifique. Chez les femmes âgées de 30 ans et plus, l'utilisation d'un test VPH accompagné du test Pap chaque 5 ans peut être utilisé comme alternative au test Pap seul à chaque 3 ans [175]. L'utilisation de ces deux tests, comparativement à la cytologie seule, augmente de 60 à 70% la protection contre le cancer du col [176]. Cependant, ce n'est pas parce qu'une femme a un résultat positif au test de VPH qu'elle a pour autant des lésions nécessitant un traitement. L'usage des deux tests pourrait donc augmenter le nombre de procédures non nécessaires chez les femmes, tout comme l'utilisation du test VPH seul en dépistage primaire [175]. Cette utilisation conjointe du test Pap et d'un test VPH générique n'est pas couramment pratiquée au Canada.

8.3.Procédures diagnostiques suite à un test de dépistage anormal

En cas d'anomalies décelées au dépistage cytologique, un examen diagnostique est nécessaire. La colposcopie est une procédure permettant de déceler les changements dysplasiques au niveau du col et d'orienter les biopsies qui permettront un diagnostic histologique [177]. La colposcopie se fait à l'aide d'un colposcope après application d'acide acétique. Une lésion, étant acidophile, réagit en absorbant l'acide acétique. L'absorption provoque une déshydratation des cellules et une coagulation temporaire des protéines du noyau cellulaire. La coloration est plus intense quand l'activité nucléaire est forte. Les lésions de haut grade et le cancer invasif sont donc colorés de façon plus intense comparativement aux lésions de bas grade. Par la suite, une solution de Lugol est appliquée. Le Lugol est absorbé par les cellules ayant une forte teneur en glycogène. L'épithélium pavimenteux normal absorbe l'iode et prend une coloration brune très foncée. L'épithélium cylindrique se colore très peu et prend une teinte jaunâtre [160]. Des biopsies dirigées vers les zones les plus anormales ou au hasard en l'absence de zone anormale permettent d'obtenir un diagnostic histologique. Lorsqu'un résultat de lésion de haut grade ou

de cancer est obtenu, la femme est orientée vers un traitement approprié. La **figure 5** résume les étapes du dépistage, du diagnostic et du traitement de lésions précancéreuses.

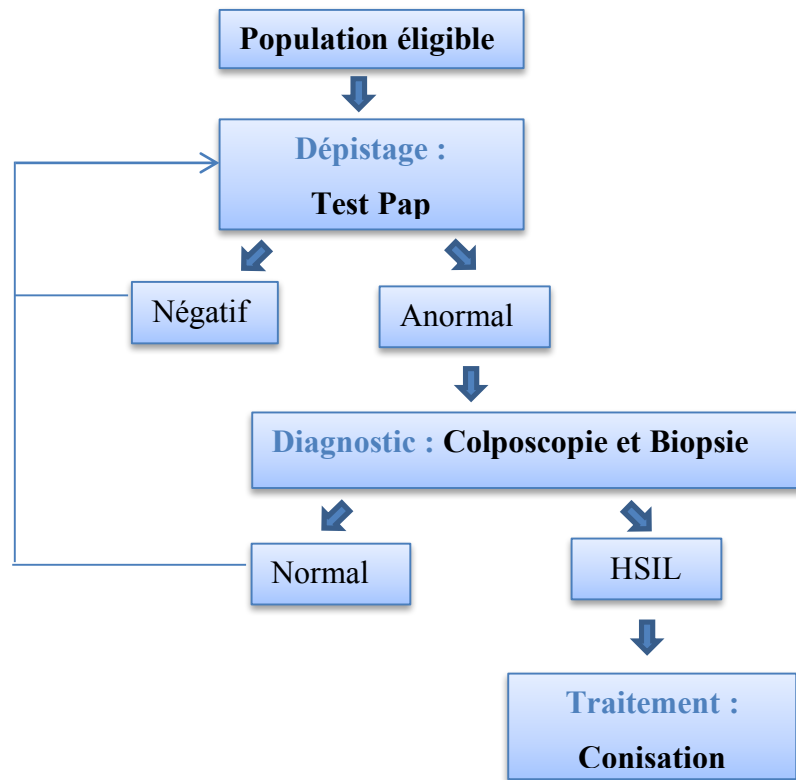


Figure 5. Résumé du processus de dépistage des lésions précurseurs du cancer du col de l'utérus au Canada. Lorsqu'une femme obtient un résultat anormal au test Pap, elle est orientée vers un dépistage en colposcopie. Au moment de la colposcopie, une biopsie peut être effectuée. L'histologie de la biopsie diagnostique permet alors d'affirmer ou d'infirmer la présence des lésions précancéreuses (HSIL). Si un diagnostic de HSIL est posé, la femme est orientée vers un traitement par conisation. Source: The Canadian Partnership Against Cancer (2011). Cervical Cancer Screening in Canada Monitoring Program Performance 2006 –2008. Toronto (ON).

9. Traitement des lésions précancéreuses du col

Pour traiter les femmes ayant un diagnostic de HSIL, on effectue une résection de la zone de transformation du col. En enlevant cette partie, on diminue fortement le risque de progression vers un état cancéreux. Pour ce faire, on utilise soit des méthodes ablatives ou des méthodes excisionnelles. Les méthodes ablatives comprennent la cryothérapie et la fulguration au laser.

La cryothérapie fait usage du froid pour détruire les lésions tandis que, comme son nom l'indique, la fulguration au laser fait usage d'un laser [7]. Ces méthodes furent introduites dans les années 70. Les méthodes ablatives ont été graduellement abandonnées en faveur des méthodes excisionnelles [177]. Plusieurs études ont conclu que la cryothérapie ainsi que la fulguration au laser sont moins efficace pour le traitement de HSIL que les méthodes excisionnelles. [178, 179]

Les méthodes excisionnelles représentent une excision d'une partie du col en forme de cône. Elles sont appelées conisation. La section enlevée inclue la zone de transformation et une portion du canal endocervical. La conisation peut être effectuée avec un scalpel, un laser ou par électrorésection par anse diathermique [7]. La technique la plus utilisée est le LEEP [177]. Cette procédure est aussi appelée large excision électro-chirurgicale à l'anse diathermique de la zone de transformation (LLETZ). Le LEEP étant le traitement favori et presque le seul utilisé au Canada [180], nous ne nous attarderons pas sur les autres méthodes de traitement. Après le LEEP, la portion du col prélevée est envoyée en microscopie. Une évaluation de l'histologie permet de vérifier l'état des cellules retirées [7].

Le traitement par LEEP de lésions précancéreuses est très efficace. Cependant, la conisation peut avoir un impact négatif sur les grossesses subséquentes des femmes traitées. L'intégrité du col étant modifiée, le LEEP est associé avec une augmentation du risque d'accouchements prématurés (moins de 37 semaines), de rupture prématurée des membranes et de faible poids à la naissance [181, 182]. Des méta-analyses ont permis de conclure que le LEEP augmente d'environ deux fois le risque d'accouchements prématurés, de rupture précoce des membranes et de faible poids à la naissance [8, 9]. Les femmes ayant subies un LEEP ont environ 5 fois plus de chances d'avoir un col court (moins de 3 cm). Ce qui est normal puisque le LEEP consiste à une résection d'une partie du col [8]. Il existe une relation inversement proportionnelle entre la longueur du col et le risque d'accouchement prématuré. Plus le col est court, plus le risque d'accouchement prématuré est élevé [183]. La prématurité augmente le risque de mort néonatale (premier 28 jours de vie). Plus l'âge gestationnel et le poids à la naissance sont faibles, plus ce risque est augmenté. Il existe de nombreuses complications liées à la prématurité. Elles incluent des problèmes respiratoires, gastro-intestinaux, cardiovasculaires

et neurologiques [184]. De plus, les traitements répétés augmentent les risques de complications obstétricales [185].

En Amérique du Nord, les femmes âgées de 25 à 30 ans ont la plus haute prévalence de lésions précancéreuses du col [186]. En 2015, la plus haute proportion de grossesse observés au Canada étaient attribués aux femmes âgées de 25 à 34 ans [187]. Les femmes recevant des traitements pour des lésions précancéreuses sont majoritairement des femmes en âge de procréer. Il est donc important d'éviter de traiter les femmes de façon non nécessaire. Le traitement doit prendre en compte les désirs de fertilité et l'âge des patientes [177].

Si la maladie atteint le stade de cancer, plusieurs méthodes de traitement peuvent être utilisées. Elles dépendent du stade atteint par la néoplasie. La radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie en sont des exemples.

10. Discordance

Les femmes diagnostiquées avec des HSIL lors de la biopsie à la colposcopie sont dirigées au traitement. En temps normal, le spécimen de traitement devrait arborer une histologie représentant des HSIL. Lorsqu'au LEEP, une femme a une LSIL ou une histologie normale, on dit qu'il y a discordance (**figure 6**). La discordance se trouve donc entre le résultat au moment du diagnostic et celui au moment du traitement. Une femme avec des résultats discordants pourrait avoir été traitée inutilement.

La discordance pourrait être due à une erreur de lecture au moment du diagnostic en colposcopie. Ceci mènerait à remettre en question les diagnostics effectués. Si le diagnostic est inexact, la femme a subi un traitement invasif qui aurait pu être évité. Si le diagnostic initial s'avérait exact, il est possible que le second spécimen du col soit négatif parce que la lésion a complètement été excisée par la première biopsie. Il deviendrait impossible de détecter la lésion lors du traitement par conisation. Dans ce cas, encore une fois, le LEEP aurait pu être évité. Il se pourrait aussi que le résultat du spécimen obtenu lors du traitement soit erroné et que les

femmes aient réellement été traitées pour des HSIL. Dans ce cas, le suivi de la femme après son traitement pourrait s'avérer inadéquat pour investiguer la récurrence de HSIL.

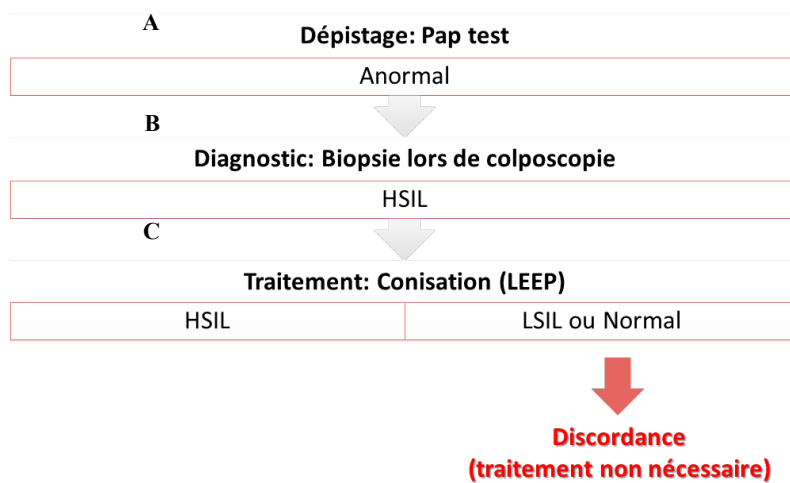


Figure 6. Définition de la discordance. (A) Lorsqu'un test de dépistage montre une cytologie anormale, les femmes sont dirigées vers un suivi en colposcopie. (B) Le diagnostic de HSIL entraîne une prise en charge des femmes au traitement par conisation (LEEP). (C) Le traitement n'est pas offert aux femmes ayant des lésions de bas grade car ces lésions régressent souvent de façon spontanée. Elles sont plutôt suivies adéquatement. Au moment du traitement, si le spécimen de conisation révèle une LSIL ou une histologie normale, on dit qu'il y a discordance.

On pourrait aussi retrouver une discordance lors de la régression naturelle de HSIL entre le moment du diagnostic et le moment du traitement. Étant donné le changement des procédures au fil du temps, seules les études datant des années 2000 ont été rapportées dans le **tableau III**. La prévalence de discordances rapportée va de 14 à 24 %. Plusieurs études n'ont inclus que les spécimens de traitement ne présentant aucune lésion. Dans notre définition de discordance, nous incluons les spécimens de traitements arborant des LSIL, puisque les LSIL représentent des lésions sans conséquences graves, qui ne nécessitent pas de traitement. Certaines prévalences rapportées au tableau III pourraient donc être une sous-estimation des prévalences de discordances réelles selon notre définition.

Tableau III. Résumé des études portant sur la discordance.

Auteur	Issue	Prévalence de discordance	Variable augmentant le risque de discordance					
			Population	Âge	Pap test	Charge virale	Génotype	Biopsie diagnostique
Walavalkar, 2016 [10]	<CIN2	100/453 (22%)	540 femmes ≥ CIN2 à la biopsie ou HSIL, ASC-H, LSIL-H au Pap test traitées par méthodes excisionnelles entre 2009 et 2012 dans la UMass pathology database	Âge plus élevé (p<0,001)	N/A	N/A	Absence de VPH oncogène ou résultat équivoque (p <0,001)	Résultat bas grade ou inadéquat à la colposcopie (p <0,001)
Giannella, 2015 [11]	<CIN2	80/585 (14%)	585 femmes avec HSIL à la biopsie diagnostique et traitée par LEEP entre 2006 et 2011 au centre Reggio Emilia et l'hôpital Cesare Magati Scandiano, Italie	Non significatif (p=0,768)	Non significatif	N/A	Absence de VPH oncogène (p<0,001)	CIN2 à la colposcopie (si non européenne et pas d'infection à VPH oncogène)
Nam, 2015 [12]	Pas de dysplasie	102/559 (18%)	673 femmes avec HSIL à la biopsie diagnostique et traitée par LEEP entre 2001 et 2010 à l'hôpital universitaire Bucheon, Corée	Non significatif (< 50 ans vs ≥ 50 ans) (p=0,991)	Non significatif (HSIL vs LSIL) (p=0,360)	Faible charge virale (<100 RLU) (p<0,001)	VPH 16 vs autre statut infectieux VPH (p=0,026)	CIN2 à la colposcopie (p <0,001)
Zhang, 2015 [188]	<CIN2	105/391 (27%)	466 femmes avec HSIL à la biopsie diagnostique et traitée par LEEP entre 2009 et 2010 à l'hôpital Qilu, Chine	Âge moins élevé (moins de 30 ans, 30-40 ans, 40-50 ans, 50 ans et plus) (p=0,039)	Non significatif (HSIL vs LSIL) (p=0,216)	Non significatif (<100 RLU) (p=0,254)	Non significatif VPH 16 vs autre statut infectieux VPH (p=0,489)	CIN2 à la colposcopie (p=0,001)

Auteur	Issue	Prévalence de discordance	Variable augmentant le risque de discordance					
			Population	Âge	Pap test	Charge virale	Génotype	Biopsie diagnostique
Rodriguez-Manfredi, 2013 [13]	Pas de dysplasie	110/687 (16%)	687 femmes avec LSIL ou HSIL traitées par LEEP entre 2008 et 2011 à l'hôpital Clinic de Barcelone	Non significatif (< 35 ans et ≥ 35 ans) (p=0,580)	Non significatif en analyse multivariée (p=0,330)	Faible charge virale (<10 RLU) (p=0,023)	Absence de VPH (p <0,001)	Non significatif en analyse multivariée CIN1 (p=0,249) ou négatif à la colposcopie (p=0,075) vs CIN2/3
Witt, 2012 [14]	<CIN2	73/306 (24%)	378 femmes avec HSIL à la biopsie diagnostique et traitées par LEEP entre 2003 et 2010 recrutée à partir des rapports de pathologie de l'université d'Utah	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ryu, 2010 [16]	Pas de CIN	34/192 (18%)	192 femmes avec CIN2-CIN3 prouvée à la biopsie et traitées par LEEP recrutée entre 2003 et 2005 dans l'hôpital universitaire Bucheon en Corée recrutée	Non significatif (< 40 ans et ≥ 40 ans) (p=0,369)	Non significatif (HSIL vs LSIL) (p=0,154)	Faible charge virale (<100 RLU) (p = 0,013)	Non significatif, VPH 16 vs autre statut infectieux VPH (p=0,221)	Non significatif (CIN2 vs CIN3) (p=0,207)

Certaines études se sont penchées sur les causes possibles de la discordance. En général, un diagnostic CIN2 à la biopsie, une charge virale faible et l'absence de VPH avant le traitement semblaient augmenter le risque de discordance [10-13, 16]. Ding et al. ont trouvé par ailleurs que 28% des femmes avec des lésions de CIN2 à la première biopsie avaient une CIN1 ou aucune lésion au moment de la seconde biopsie [189]. Sherman et al ont trouvé que 33% des femmes ayant un résultat initial au Pap test ASC-US ou LSIL ont obtenu un LEEP négatif pour des HSIL [190]. Toutes ces femmes avaient pourtant été diagnostiquées avec des HSIL à la biopsie diagnostique. Aucune étude ne s'est encore penchée sur l'importance des variantes des types infectant les femmes traitées. Les résultats de quelques études sur la charge virale, l'âge, et l'ethnicité sont contradictoires [10, 16].

En identifiant les facteurs viraux ou cliniques influençant la discordance, des traitements inutiles pourraient être évités. Le dépistage se fait sur une population asymptomatique dont la majorité ne développera peut-être jamais de cancer du col. Il est donc très important que le programme de dépistage n'entraîne pas de complications à ces femmes.

Objectifs

Objectif général:

Dans le présent projet, nous cherchons à identifier des caractéristiques virales associées à la discordance.

Objectifs spécifiques :

1. Déterminer si la présence de HR-VPH, tel que déterminé par un test générique, est associée à la discordance.
2. Déterminer si certains géotypes spécifiques, tel que déterminé par le test Linear Array, sont associés à la discordance.
3. Déterminer si la charge virale est associée à la discordance.
4. Déterminer si certaines variantes de types sont associées à la discordance.

Matériel et méthodes

1. Population source et population à l'étude

Pour répondre à notre question de recherche, nous avons utilisé les données provenant de participantes recrutées dans le cadre de l'étude CoHIPP (Colposcopy versus HPV testing to Identify Persistent Precancers post treatment). Cette étude a recruté, entre 2010 et 2013, 2167 femmes subissant une conisation suite à un premier diagnostic de HSIL du col. Le recrutement a eu lieu dans 13 centres de colposcopie au Canada (**annexe 1**). Les critères d'inclusion de CoHIPP étaient : (a) être âgée de 18 ans et plus (19 ans en Colombie Britannique, Nouvelle-Écosse, Terre-Neuve-et-Labrador), (b) avoir une compréhension du français ou de l'anglais suffisante pour l'étude et les risques associés, (c) être traitée pour la première fois pour des lésions CIN 2, 3 ou AIS prouvées par biopsie, (d) donner son consentement libre et éclairé pour participer à l'étude.

Les critères d'exclusion de CoHIPP permettaient d'assurer que le traitement par conisation et le suivi proposé n'étaient pas contraindiqués. Ces critères étaient : (a) être immunosupprimée (b) avoir une hystérectomie planifiée (c) avoir reçu ou recevoir les traitements immunosuppresseurs (d) avoir une forte probabilité de ne pas respecter les exigences de l'étude.

CoHIPP ne comportait qu'un nombre limité de critères d'exclusion (4) et la grande majorité de femmes éligibles rencontrées ont accepté de participer. Sur 3052 femmes rencontrées, seulement 480 (15,7%) n'étaient pas éligibles. En ce sens, il est probable que la population de CoHIPP représente assez bien celle des femmes subissant un premier traitement pour des HSIL au Canada.

Le but de CoHIPP est de déterminer si un suivi basé sur des tests VPH est plus sensible que le suivi habituel en clinique pour reconnaître les échecs du traitement. Les femmes ont été recrutées au moment du traitement, qui correspond à la visite 1 de CoHIPP (**figure 7**). Si la HSIL a été confirmée sur le spécimen de conisation, les femmes ont été randomisées 6 mois plus tard (visite 2), et revues ensuite aux mois 12 et 24 (visites 3 et 4). Les femmes chez qui la

conisation n'a pas confirmé de HSIL ont été exclues de CoHIPP. Par contre, elles nous ont donné l'autorisation d'obtenir les données cliniques de leur suivi durant les 2 années suivantes. L'organigramme complet de l'étude CoHIPP est présenté en annexe (**annexe 2**).

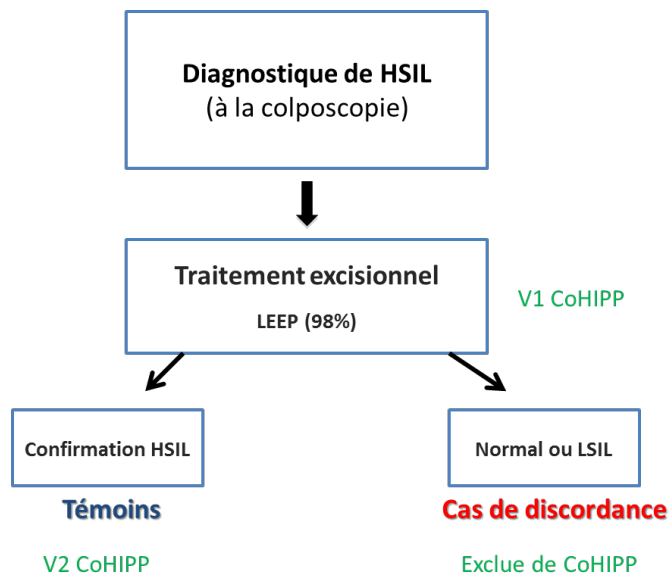


Figure 7. Organigramme simplifié de la présente étude. Les cas et les témoins de la présente étude ont été tirés de l'essai randomisé CoHIPP. Les femmes recrutées dans l'étude CoHIPP ont toutes obtenues un traitement excisionnel (98% effectué par LEEP) après un diagnostic colposcopique de HSIL. Le traitement constituait la visite 1 de CoHIPP. Après lecture du spécimen de biopsie obtenu au moment du traitement, les femmes ayant une confirmation de HSIL continuaient à la visite 2 de CoHIPP. Ces femmes représentent nos témoins concordants. Les femmes ayant un résultat normal ou LSIL à la lecture histologique du spécimen de traitement étaient exclues de CoHIPP. Ces femmes représentent nos cas de discordances.

2. Devis d'étude

Le devis utilisé pour répondre à notre question de recherche est un devis cas-témoins niché dans un essai contrôlé randomisé. Une étude de cohorte aurait demandé de déterminer l'exposition pour toute la population de CoHIPP. Ce travail aurait été ardu et dispendieux. En effectuant une étude cas-contrôle nichée dans CoHIPP, nous devons déterminer l'exposition (génotypes de VPH, la variante et la charge virale) pour les 710 participantes incluses dans la présente étude. Notre population d'étude n'est pas affectée par la randomisation effectuée dans CoHIPP. Elle profite du fait que la population de CoHIPP est représentative de celle des Canadiennes traitées pour des HSIL.

3. Issues : définition des cas et des témoins

La présence ou l'absence de discordance constitue l'issue d'intérêt de notre projet. Au moment du traitement (visite 1 de CoHIPP), si la femme présentait une histologie normale ou LSIL, elle était exclue de CoHIPP. Ces femmes constituent les cas de discordance : elles ont été diagnostiquées pour des HSIL à la biopsie et, au moment du traitement, elles n'avaient pas de HSIL. Notre population regroupe 355 cas de discordance. Par contre, quand le spécimen excisé confirmait un HSIL, la femme poursuivait avec la visite 2 de CoHIPP. Ces femmes ne sont pas discordantes et constituent le groupe témoin (355 témoins) (**figure 7**). Chaque cas de discordance a été apparié à un témoin selon le moment du recrutement (à l'intérieur de 3 mois du recrutement du cas) et le centre de colposcopie. L'âge de chaque participante est connu et pourra être pris en compte dans l'analyse.

4. Variables virales d'intérêt : définitions et mesures

Lors de la visite 1, juste avant le traitement, des spécimens cervicaux ont été mis en banque pour toutes les participantes. Le prélèvement des cellules exfoliées du col de l'utérus des participantes a été fait à l'aide d'une cytobrosse. Le PreservCyt (Hologic Inc) est un milieu liquide utilisé pour le diagnostic cytologique. Ce milieu est à base de méthanol, permettant de conserver l'intégrité des cellules épithéliales. Les spécimens prélevés dans du PreservCyt ont été conservés à 4 °C jusqu'au traitement de l'échantillon selon les directives du fabricant. Tous les tests effectués sur les spécimens en banque ont été effectués dans un laboratoire certifié pour les tests VPH. Lors de la présente étude, nous nous sommes penchés sur 3 variables d'intérêts; le génotype, la charge virale ainsi que le polymorphisme pour les génotypes 16, 18 et 31.

Le test Hybrid Capture 2 (Digene Corporation) est un test générique qui a permis de déterminer la présence ou l'absence d'ADN de HR-VPH. Le(s) génotype(s) contenus dans les spécimens positifs par HC2 ont été identifiés en effectuant le test Linear Array (Roche

Molecular Systems Inc). Ce dernier test permet de détecter séparément 36 génotypes de VPH (à haut-risque ou à bas-risque). Ce test nous a aussi permis de déterminer le nombre de types infectants. La charge virale a été estimée par PCR en temps réel. Les variations intra-typiques de certains VPH ont été obtenues par séquençage d'un amplicon de la région 3' du LCR.

4.1. Test Hybrid capture 2

Le Hybrid Capture 2 High-Risk VPH DNA test (HC2) ® de Qiagen est approuvé par Santé Canada à des fins de diagnostic. Il permet la détection d'ADN de VPH de 13 types oncogènes ; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Les limites de détections du HC2 est de 1000 copies. Nous avons suivi le protocole du manufacturier. Le test HC2 comporte une hybridation des acides nucléiques du spécimen avec des sondes d'ARN de VPH qui sont par la suite détectés avec une méthodologie d'amplification de signal en microplaque par chimioluminescence. L'ADN du spécimen est d'abord dénaturé avec l'ajout de NaOH, puis est hybridé avec un mélange de sondes d'ARN ciblant 13 génotypes de HR-VPH. Les hybrides ADN-ARN sont capturés à la surface d'une microplaque par des anticorps spécifiques pour la conformation d'hybrides ADN-ARN.

Les anticorps monoclonaux spécifiques aux hybrides ADN-ARN couplés marqués avec une phosphatase alcaline sont alors ajoutés et reconnaissent la conformation des hybrides d'ADN-ARN déjà fixés dans les puits de la microplaque. Suite au lavage des puits, un substrat chimioluminescent est par la suite ajouté et clivé par la phosphatase alcaline si les anticorps monoclonaux ont réagi avec des hybrides d'ADN-ARN de HR-VPH. La réaction engendre la production de lumière qui est ensuite mesurée en unités relatives de lumière dans un luminomètre. Une mesure de lumière supérieure à la valeur seuil d'un témoin positif (correspondant à 10^5 copies d'ADN de VPH) indique la présence d'ADN d'un des treize VPH oncogènes, sans distinction du type infectant.

Pour effectuer ce test, les spécimens reçus pour chaque participante et conservés dans un milieu cytologique liquide PreservCyt, ont été utilisés. Le protocole est décrit plus bas.

4.2. Préparation des contrôles

Un contrôle négatif et un contrôle positif sont utilisés pour chaque série de spécimens testés. Le contrôle négatif contient un LR-VPH tandis que le contrôle positif faible contient un HR-VPH. Les contrôles sont effectués en triplicata. En plus des contrôles négatifs et positifs, deux contrôles de qualité sont inclus : un pour les LR-VPH (VPH6) et l'autre pour les HR-VPH (VPH16). Tous les contrôles ont été dénaturés à l'aide de la solution de dénaturation fourni par le manufacturier. 1000 µL de cette solution a été ajouté au contrôle négatif et 500 µL a été ajouté au contrôle positif et au contrôle de qualité pour HR-VPH et LR-VPH. Suite à l'ajout de cette solution, ils ont été mélangés à l'aide du vortex durant 5 secondes puis incubés au bain-marie à $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant 60 minutes. Une fois dénaturées, ces échantillons contrôles peuvent être conservées à 4°C pour une nuit ou -20°C pour 3 mois.

4.3. Traitements des spécimens dans un milieu cytologique liquide

PreservCyt

Quatre mL de liquide cytologique traité permet d'effectuer 2 tests de HC2 par échantillon. Pour 4 mL de PreservCyt, 0.4 ml de tampon «Sample conversion Buffer» a été ajouté. Puis une centrifugation à 2900xg (3800 RPM) pour 15 minutes a été faite. Le surnageant a ensuite été éliminé. Un tampon de préparation de spécimen (STM) a été mélangé avec le réactif de dénaturation (DNR) avec une proportion 2:1. Pour 4 mL de PreservCyt, 120 µL de tampon de préparation et 60 µL de réactif de dénaturation ont été utilisés. La solution STM-DNR a été rajoutée aux culots puis agitée au vortex au moins 30 sec à vitesse maximale. Après une incubation de 15 minutes dans un bain-marie à 65°C , les spécimens ont de nouveau été agités au vortex durant 15-30 sec. Le culot ne devait plus être visible à cette étape. Dans le cas contraire, le spécimen était considéré comme inadéquat. Enfin, les spécimens ont été placés de nouveau dans le bain-marie à 65°C pour 30 minutes.

4.4. Hybridation des spécimens dénaturés

Une microplaque de 96 puits a été utilisée pour l'hybridation. Après avoir été mélangés par vortex, 75 µL de spécimens dénaturés ont été distribués dans chaque puits de la microplaque.

La plaque a ensuite été incubée durant 10 minutes à 20-25 °C, puis 25 µL de la sonde B a été ajoutée dans chaque puits. La plaque a été agitée durant 3 min \pm 2 min à 110 tours/min à 20-25 °C. La réaction engendre l'apparition de coloration jaune dans les puits. Si la couleur n'apparaissait pas, 25 µL de sonde B était ajoutée. Il est essentiel que la couleur jaune apparaisse pour poursuivre les étapes. La plaque a ensuite été incubée à 65 \pm 2 °C pendant 60 minutes \pm 5 min.

Le contenu des puits a par la suite été transféré dans une plaque de capture. Puis une agitation rotative à 1 100 \pm 100 rpm à 20-25 °C pendant 60 \pm 5 min a été faite. Le contenu des cupules a ensuite été jeté. Soixante-quinze µL de réactif 1 a été ajouté par pipetage inversé à chaque cupule. Puis, elles ont été incubées à 20-25 °C pendant 30-45 minutes et la plaque a été soumise au lavage des puits par un laveur automatique. Pour ce faire, la solution de lavage préparé tel que décrit par le fournisseur a été utilisé et 6 cycles de remplissage/ aspiration ont été effectués par le laveur automatique. La solution utilisée pour le laveur automatique est une solution contenant 1,5% w/v d'azoture de sodium. Soixante-quinze µL de réactif 2 ont ensuite été ajoutés par pipetage inversé dans chaque puits. Les puits devaient, à cette étape, avoir une coloration jaune d'intensité similaire. La plaque a été incubée à 20-25 °C durant 15 minutes à l'abri de la lumière. La plaque a ensuite été lue dans un luminomètre DML 2000 (QIAGEN) après 15 minutes (sans dépasser 30 minutes).

La valeur seuil était déterminée en effectuant une moyenne des 3 valeurs obtenues pour le contrôle positif faible (effectué en triplicata). Lorsque le ratio était inférieur à 1, le spécimen était considéré comme négatif. Lorsque le ratio était de plus de 2,5, le spécimen était catégorisé comme positif. Lorsque le ratio échantillon/valeur seuil était entre 1 et 2,5, ils étaient testés une seconde fois pour s'assurer de la validité de la réponse. Lors du second test, le résultat était considéré positif si le ratio était de ≥ 1 . Si le résultat du second test était inférieur à 1, le spécimen devait être re-testé une troisième fois pour obtenir un résultat final.

4.5.Purification d'ADN par Master Pure

Le protocole de Master Pure (Epicentre) a été utilisé pour purifier l'ADN à partir des spécimens de col contenus dans la solution PreservCyt [191]. Dix mL de cellules en suspension ont été centrifugés durant 10 minutes à 3000 RPM à 4 °C, puis le culot a été resuspendu dans 1 mL de TE (Tris 10 mM, pH 8,3, EDTA 0,1 mM). Le Master-Pure kit d'Epicentre a été utilisé pour effectuer la purification. La Protéinase K (PK), une sérine protéase agissant contre de nombreuses protéines, a été diluée dans une solution «2 X T and C Lysis Solution» (1,5 µL de Protéinase K pour 150 µL de solution de lyse). Le mélange a été ajouté à chaque spécimen (150 µL de spécimen) et mélangé à l'aide d'un vortex par pulsation 2 à 3 fois.

Les échantillons ont ensuite été incubés à 65°C pendant 20 minutes (ou plus). À toutes les 7,5 minutes, les spécimens ont été mélangés dans un vortex par pulsation 2 à 3 fois. Lorsque la lyse semblait difficile, 2 µL de PK furent ajoutés. Après la lyse, une incubation sur glace durant 5 minutes a été effectuée suivi d'une brève centrifugation. Toujours sur glace, 175 µL de « MPC Protein Precipitation Reagent » ont été ajoutés au spécimen lysé. Les spécimens ont été agités dans un vortex à pulsation durant 10 secondes puis remis sur glace pour 2 minutes. Après une centrifugation à 21,100 x g pendant 10 minutes à température de la pièce, les spécimens ont été déposés sur glace afin de rendre le culot opaque. Le surnageant (contenant l'ADN) a été transféré avec 500 µL d'isopropanol et le culot (contenant les débris cellulaires) a été jeté. Après avoir bien mélangé la solution d'isopropanol et d'ADN, les tubes ont été placés à 4°C pendant 1-2 nuits afin que l'ADN précipite.

Par la suite, l'ADN a été mis en culot par centrifugation (13 200 RPM à 30 minutes à température de la pièce). Le culot a été bien rincé deux fois, d'abord avec 750 µL puis avec 250 µL d'éthanol 75%. À chaque rinçage, les tubes étaient bien mélangés et centrifugés pendant 2 minutes. L'éthanol a été jeté et le culot séché à l'air durant 20 min. Par la suite, le culot a été resuspendu dans 50 µL de TE, placé 20 minutes à température pièce puis placé à 4°C pour une nuit. L'ADN purifié était gardé à -30°C.

4.6. Détection des VPH par Linear Array

L'ADN purifié par MasterPure a été utilisé pour effectuer une analyse individuelle des types de VPH infectant les participantes. Le test du Linear Array (LA) de Roche Diagnostics a permis cette analyse [192]. Le seuil de détection de HR-VPH est plus bas pour le Linear Array que pour le Hybrid Capture 2 décrit précédemment. La limite de détection du LA est de 1 à 1000 copies [193]. La réaction du LA est une réaction de co-amplification des VPH et de la β -globine cellulaire. La β -globine permet de déterminer si le spécimen est adéquat en vérifiant la présence d'inhibiteurs ou d'ADN dégradé. Lorsque la β -globine n'est pas détectée, le spécimen est inadéquat. Les amplicons sont générés grâce à des amorces PGMY09-PGMY11 [194]. Le test permet de détecter 36 types de VPH : 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34 (était 64), 35, 39, 40, 42, 44 (était 55), 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 et 89. Une sonde spécifique pour chacun de ces types est fixée sur une bandelette sur une ligne individuelle à l'exception du type 52. Chaque ligne de la bandelette du LA représente donc un type particulier. La ligne pour VPH52 correspond à une sonde oligonucléotidique s'hybridant avec les génotypes 52, 33, 35 et 58. Lorsque cette ligne est positive, au moins 1 des 4 types est présent. On ne peut donc pas conclure avec certitude qu'il s'agit du type 52. Il faut alors effectuer un test supplémentaire de PCR en temps réel spécifique pour le type 52 [195].

La première étape du LA consiste en une amplification par PCR. Pour 5 μ l de spécimen (ADN préalablement purifié par Master-Pure) amplifié, 50 μ l du mélange réactionnel (master mix) et 45 μ l d'eau déionisée sont ajoutés. L'expérience contient un contrôle positif (ADN de VPH16 et de β -globine) et un contrôle négatif (tampon Tris-HCl). Le contrôle négatif permet de vérifier l'absence de contamination durant les manipulations. L'amplification a été effectuée par la GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Le protocole d'amplification utilisé était de 2 min à 50°C, 9 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 30 sec à 95°C (dénaturation), 1 min à 55°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation). La température a ensuite été maintenue à 72°C. Durant ce processus, l'ADN polymérase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) amplifie une région de L1 du génome des VPH et une région du gène de β -globine.

Les amplicons produits sont ensuite déposés sur les bandelettes de génotypage et s'hybrident avec les sondes spécifiques de génotype fixées individuellement sur des lignes précises de la bandelette. Les amorces PGMY étant marquées avec de la biotine, les amplicons sont aussi marqués à la biotine. Un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort se lie sur la biotine marquant les amplicons hybridés aux sondes des bandelettes. Un substrat peroxyde d'hydrogène et de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) est oxydé. Un précipité bleu est formé sur les lignes de la bandelette ayant réagi avec les amplicons. Lorsque les résultats d'un spécimen démontrent la présence de β -globine et l'absence d'ADN de VPH, le spécimen est négatif. Si la quantité d'ADN viral est insuffisante pour le seuil de détection, le résultat pourrait être faussement négatif. Étant donné que le test utilisé est en mesure de détecter jusqu'à une copie par cellule, il faudrait une charge virale très basse, presque nulle, pour ne pas qu'elle soit détectée. Les spécimens avec un résultat négatif pour les types détectés par le LA ont été analysés avec des amorces consensus GP5+-GP6+ de L1 [196]. Le GP5-GP6 a une meilleure capacité de détection des VPH que le LA. Il a donc permis de confirmer l'absence de VPH observée initialement par LA ([197]).

L'amplification a été faite par la GeneAmp®PCR System 9600 (Perkin Elmer). Un contrôle négatif (eau distillée) et un contrôle positif (pVPH16 d'une dilution de 1 ng par 10 μ L) ont été utilisés. L'amplification produit une séquence de 145 paires de bases qui a été purifiée grâce à la trousse QIAquick gel (QIAGEN). Les spécimens ont ensuite été testés par électrophorèse sur gel pour vérifier la présence du fragment. L'absence du fragment indique l'absence d'ADN de VPH. Cette technique est sensible pour la détection d'ADN de VPH dans des spécimens négatifs au LA puisque l'amplicon produit est plus court que celui généré avec les amorces PGMY [198].

4.7. Charge virale

La charge virale des types 16, 18 et 31 a été mesurée par PCR en temps réel pour les spécimens positifs pour ces types au LA. Les types 16 et 18 ont été analysés à cause de leur importance sur le plan clinique. Le type 31 a été analysé parce qu'après le type 16, il s'agissait du type le plus prévalent dans notre population. La charge virale a été évaluée par trois réactions

de PCR en temps réels par spécimen analysé. Le premier PCR a permis d'investiguer la présence d'inhibiteur dans les échantillons préalablement purifiés en utilisant un contrôle interne tel que décrit dans le prochain paragraphe. Une fois l'absence d'inhibition établie, les spécimens ont été analysés en duplicata pour quantifier la β -globine (teneur cellulaire) et le nombre de copies d'ADN de VPH. Un ratio entre les résultats trouvés pour la β -globine et pour les VPH permettaient de déterminer le nombre de copies de VPH/ cellule. Par la suite, cette mesure a été convertie en \log_{10} . L'instrument Light Cycler PCR and detection system (Roche Molecular Systems, Laval, Quebec) a permis d'effectuer les PCR en temps réel.

Pour le test d'inhibition utilisant un contrôle interne, un nombre connu de copies de contrôle interne (1,000 copies habituellement) est ajouté à un aliquot de 2 μ L de chaque spécimen. Un test de PCR quantitatif permet alors de déterminer si la quantité de contrôle interne détectable correspond à la quantité véritablement ajoutée au spécimen. Ce qui permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs du PCR [199, 200].

Les concentrations finales du master mix (MM) utilisées sont de : 2,0mM $MgCl_2$, 0,3 pmoles pSP65ci-F, 0,3 pmoles pSP65ci-R, 0,05 μ M pSP65ci-TM, 0,1 μ M de FastStart. Des volumes totaux de 20 μ L (16 μ L de MM) ont été analysés dans le Light Cycler (Roche Molecular Systems, Inc) pour chaque spécimen. Le contrôle négatif qui a été utilisé contient 4 μ L d'eau et 16 μ L de MM. Dans tous les échantillons, sauf le contrôle négatif, 1 000 copies de contrôle interne ont été ajoutés à 2 μ L d'ADN extrait. Un standard a été utilisé en duplicata. Le standard est composé de 1000 copies de contrôle interne et 2 μ L d'eau distillée. Le protocole utilisé pour la réaction d'amplification est le PG2002-60C décrit dans le **tableau IV**. Le nombre de copies de contrôle interne par échantillon a été inféré grâce à une courbe standard générée avec des concentrations décroissantes du contrôle interne analysées en triplicata. Les concentrations étaient de 1, 10, 100, 1000, 10 000, 100 000, 1 000 000 copies de contrôle interne (pSP65ci). La courbe produite permet d'inférer des résultats pour des valeurs allant de 1 copie à 1 000 000 de copies de contrôle interne (dynamic range). Lorsque les contrôles négatifs et positifs étaient adéquats et que la réaction pour la détection de 1 000 copies de contrôle interne produisait un signal correspondant à au moins de 700 copies de contrôle interne, le spécimen était considéré adéquat pour analyse. Si moins de 700 copies de contrôle interne étaient détectées pour un

spécimen, la présence d'un inhibiteur était suspectée[199, 200]. Des dilutions du spécimen étaient effectuées jusqu'à ce que l'amplification du contrôle interne génère un signal correspondant à au moins 700 copies de contrôle interne. Plus l'inhibition est forte, plus le facteur de dilution utilisé est grand. Les spécimens et les dilutions de spécimens produisant un signal correspondant à au moins 700 copies de contrôle interne furent ensuite analysés pour quantifier la β -globine et le VPH16.

Pour la β -globine, les concentrations finales du MM étaient de : 4,5 mM $MgCl_2$, 0,3 pmoles GH20, 0,3 pmoles PCO4, 0,05 μM de GLOB-Tm, 0,1 μM de FastStart. Des volumes totaux de 20 μL (18 μL de MM) ont été insérés dans le Light Cycler. Le contrôle négatif utilisé était constitué de 2 μL d'eau et 18 μL de MM. Le contrôle négatif était adéquat s'il ne générait pas de signal au light cycler. Un contrôle faiblement positif de 2 000 copies d'ADN génomique fut analysé en duplicata. Ce contrôle a servi de point repère pour la courbe standard. Un contrôle fortement positif de 20 000 copies d'ADN génomique a aussi été utilisé en uniplicata. Ce contrôle positif a été traité comme un inconnu. Il a permis de vérifier que la réaction de PCR a permis de générer un signal représentant 20 000 copies d'ADN génomique. Le protocole qui a été utilisé pour la réaction de PCR est le SWAN1999. Il est décrit dans le tableau IV. La réactivité obtenue pour chaque échantillon a été comparée aux résultats d'une courbe standard pour inférer le nombre de copies de β -globine. La courbe standard a été construite grâce à l'analyse de concentrations décroissantes de β -globine de 1 000 000 de copies à 1 copie par réaction (dynamic range). La courbe a été tracée en utilisant le logarithme de la quantité de β -globine en fonction du cycle d'apparition du signal. Le cycle d'apparition du signal de chaque spécimen testé a permis d'inférer le nombre de copies de β -globine présentent dans l'échantillon.

Pour la quantification du VPH16 les concentrations finales du master mix étaient de : 3,0 mM $MgCl_2$, 0,3 pmoles PG16-F, 0,3 pmoles PG16-R, 0,05 μM PG16-TM, 0,1 μM de FastStart. Des solutions totales de 20 μL (16 μL de MM) ont été analysées dans le Light Cycler. Le contrôle négatif utilisé contenait 2 μL d'eau, 2 μL d'ADN génomique et 16 μL de MM. Un contrôle faiblement positif contenant 1 000 copies de VPH16 et 2 000 copies d'ADN génomique a été utilisé. Ce contrôle a servi de point de repère pour la courbe standard. Un contrôle fortement

positif contenant 10 000 copies de VPH16 ainsi qu'un contrôle de 2 000 copies ont aussi été utilisés. Le protocole d'amplification est détaillé dans le tableau IV (PG2002). La courbe standard utilisée pour inférer le nombre de copies de VPH16 a été générée de la même façon que celle de la β -globine, à la seule différence que chaque dilution de pVPH16 et les contrôles a été mélangée avec 2 000 copies d'ADN génomique pour mimer un vrai spécimen.

Pour la quantification du VPH18 les concentrations finales du master mix étaient de: 3,0 mM $MgCl_2$, 0,3 pmoles PG18-F, 0,3 pmoles PG18-R, 0,05 μM PG18-TM, 0,1 μM de FastStart. Des solutions totales de 20 μL (16 μL de MM) étaient insérées dans le Light Cycler. Le contrôle négatif utilisé était 2 μL d'eau, 2 μL d'ADN génomique et 16 μL de MM. Un contrôle faiblement positif incluant 1 000 copies de VPH18 et de 2 000 copies d'ADN génomique a été utilisé lors de chaque expérience. Il a permis d'établir une valeur sur la courbe standard. Un contrôle fortement positif contenant 10 000 copies de VPH18 avec 2 000 copies d'ADN génomique a aussi été utilisé. Il a permis de vérifier la qualité de la réaction d'amplification. Le protocole de PCR utilisé est détaillé dans le tableau IV. Les signaux générés par chaque spécimen ont permis d'inférer le nombre de copies de VPH18 grâce à une courbe standard. La courbe standard utilisée a été construite de la même façon que la courbe de VPH16.

Pour la quantification du VPH31 les concentrations finales du master mix étaient de : 3,0 mM $MgCl_2$, 0,3 pmoles PG31-F, 0,3 pmoles PG31-R, 0,05 μM PG31-TM, 0,1 μM de FastStart. Des solutions totales de 20 μL (16 μL de MM) ont été analysées dans le Light Cycler. Le contrôle négatif utilisé contenait 2 μL d'eau, 2 μL d'ADN génomique et 16 μL de MM. Un contrôle faiblement positif contenant 1 000 copies de VPH31 et 2 000 copies d'ADN génomique a été utilisé. Il a servi de repère sur la courbe standard. Un contrôle fortement positif contenant 10 000 copies de VPH31 avec 2 000 copies d'ADN de globine a été utilisé. Ce contrôle a permis de vérifier l'efficacité de la réaction de PCR. Le protocole de PCR est détaillé dans le tableau IV (PG2002-58C). Une courbe standard a été générée de la même façon que pour les VPH16 et VPH18. Le « dynamic range » est de 10 à 1 000 000 de copies pour les test VPH16, VPH18 et VPH31.

4.8. Protocole pour le séquençage

Finalement, lorsque les spécimens étaient positifs au Linear Array pour les types 16, 18 et 31, une analyse du polymorphisme des isolats a été effectuée. Pour ces trois types, les détails du protocole des PCR d'amplification et des amorces utilisées sont présentés dans le tableau V. L'appareil utilisé pour effectuer les PCR est la GeneAmp PCR system 9700.

Pour l'amplification par PCR, un contrôle négatif (eau) et un contrôle positif (pHPV16, pHPV18, pHPV31) ont été utilisés pour chaque plaque effectuée. Pour la réaction de PCR pour VPH16, 99 µL de MM ont été ajoutés à 1 µL d'eau (contrôle négatif), 1 µL de pVPH16 0,1pg/µL et 1 µL d'ADN de spécimen préalablement purifié par Master Pure. Les 99 µL de MM contenait 71 µL d'eau, 10 µL de tampon 10 X, 6 µL de MgCl₂ (1,5mM), 10 µL de dNTP, 0,5 µL de 16-LCR-1 (50 pmol/ µL), 0,5 µL de 16-LCR-2 (50 pmol/ µL) et 1 µL d'AmpliTaq GOLD. Les mêmes volumes ont été utilisés pour effectuer la réaction d'amplification pour VPH18.

Pour effectuer la réaction de PCR pour VPH31, 99 µL de MM ont été ajoutés à 1 µL d'eau (contrôle négatif), 1 µL de pVPH31 1000 copies/ 2 µL ainsi que 1 µL d'ADN de spécimen. Les 99 µL de MM contenait 69 µL d'eau, 10 µL de tampon 10 X, 8 µL de MgCl₂ (2 mM), 10 µL de dNTP, 0,5 µL de 31-LCR-1 (50 pmol/ µL), 0,5 µL de 31-LCR-2 (50 pmol/ µL) et 1 µL d'AmpliTaq GOLD.

Les produits d'amplification ont par la suite été déposés dans les puits d'un gel d'agarose pour vérifier si les séquences du LCR avaient été amplifiées. En présence d'une bande spécifique de la longueur attendue, les amplicons ont été purifiés grâce à une technique de purification sur plaque avec le programme ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. Cette technique permet la purification d'ADN allant de moins de 100 pb à près de 20 Kb selon le protocole du fournisseur. L'ADN purifié a ensuite été séquençé avec la trousse de séquençage cyclique de BigDye (BigDye terminator ready reaction kit; Perkin-Elmer) sur un séquenceur ABI PRISM 3100 [201] selon le protocole du fournisseur, en séquençant les deux brins d'ADN.

Le séquençage a été effectué une seconde fois pour valider toute nouvelle mutation observée. Les nouvelles mutations sont les mutations n'ayant pas encore été trouvées pour un type dans nos différentes études ou décrites dans la littérature. Les séquences obtenues ont été comparées deux par deux au prototype pour les VPH16, 18 et 31. Les numéros associés aux prototypes dans GeneBank sont respectivement U89348, KF700204 et J04353. La comparaison a été effectuée à l'aide du programme BLAST sur le site internet du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Un arbre phylogénétique a été construit pour les trois types grâce à l'algorithme neighbor-joining en utilisant le logiciel MEGA 5.2.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [202]. Le logiciel TFSEARCH a été utilisé pour vérifier les sites de liaison de protéines cellulaire au niveau d'une région du LCR pour le type 16. La recherche a été effectuée pour le prototype de VPH16 et chaque variante [203]. Les résultats de cette recherche sont présentés en annexe.

Toutes les personnes effectuant des analyses en laboratoire étaient à l'aveugle ne connaissant pas le groupe d'étude des participantes (cas ou témoins), le centre d'appartenance des échantillons ou les caractéristiques des participantes. De plus, l'entrée des données a été vérifiée au moins à deux reprises. Que ce soit pour les caractéristiques obtenues des dossiers cliniques ou les résultats de laboratoire, toutes les données ont été vérifiées, et ce, pour minimiser le risque d'erreur et diminuer le biais possible.

Tableau IV. Détails des protocoles de séquençages utilisés pour la charge virale

	Amorce F	Sonde	Amorce R	Gène	Programme
Contrôle Interne	pSP65ci-F ACG GTG AAA ACC TCT GAC ACA	pSP65ci-TM CGG AGA CGG TCA CAG CTT GTC	pSP65ci-R CCT ATA TCG CCG ACA TCA CC	N/A	PG2002 - 60C 10m-95C + 50X (15s-95C + 30s-60C) + 30sec 40C
Globine	GH20 GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	GLOB-TM CCC TAG GGT TGG CCA ATC TAC TC	PC04 CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	Globine	SWAN 1999 7m-95C + 50X (15s-95C + 5s-60C + 45s-65C) + 30s-40C
VPH16	PG16-F (pb: 231 à 250) ATG ACT TTG CTT TTC GGG AT	PG16-TM (pb: 365 à 389) ACG GTT TGT TGT ATT GCT GTT CTA A	PG16-R (pb: 434 à 453) CTT TGC TTT TCT TCA GGA CA	E6	PG2002 10m-95C + 50X (15s-95C + 30s-55C) + 30sec 40C
VPH18	PG18-F (pb: 667 à 685) ATG TCA CGA GCA ATT AAG C	Pg18-TM (pb: 725 à 744) CGG GCT GGT AAA TGT TGA TG	PG-18-R (pb: 782 à 803) TTC TGG CTT CAC ACT TAC AAC A	E7	PG2002 10m-95C + 50X (15s-95C + 30s-55C) + 30sec 40C
VPH31	W31-F (pb: 6500 à 6519) GCT CAG GGA CAC AAT AAT GG	W31-TM (pb: 6574 à 6596) TTG CAG CAC AAA CAG ACA TAT TG	W31-R (pb: 6748 à 6767) CAA AAT TCC AAT CTT CCA AA	L1	PG2002 - 58C 10m-95C + 50X (15s-95C + 30s-58C) + 30sec 40C

Tableau V. Amorces utilisées pour les réactions de PCR d'amplification et de séquençage

Types	Brin codant	Brin anti-codant	Fragment (pb)	Programme de PCR d'amplification	Programme de PCR de séquençage
VPH16	16-LCR-1 5'- TCGGTTGCATGCTTTTTGGC- 3'	16-LCR-2 5'- CCGTTTGCACACACCCATGT- 3'	20	(95°C/ 3 :30 min) X 1 (95°C/ 0 :30 min, 59°C/ 0 :30 min, 72°C/0 :30 min) X 60 (72°C/10 :00 min) X 1 et 4°C/∞	96°C/1 :00 min 96°C/0 :10 min 50 °C/1 :00 min 60°C/4 :00 min 4°C/∞
VPH18	18-LCR-1 5'- TCGGTTGCCTTTGGCTTATG- 3'	18-LCR-2 5'- CGGTTGCATAAACTATGTAT- 3'	20	(95°C/ 3 :30 min) X 1, (95°C/ 0 :30 min, 55°C/ 0 :30 min, 72°C/0 : 30 min) X 60 (72°C/10 :00 min) X 1 et 4°C/∞	
VPH31	31-LCR-1 5'-CAGCATCTACCACTACAC - 3'	31-LCR-2 5'-GGCGTGACACCTAAATTAT -3'	18(F) 19(R)	(95°C/ 3 :30 min) X 1 (95°C/ 0 :30 min, 55°C/ 0 :30 min, 72°C/0 :30 min) X 60 (72°C/10 :00 min) X 1 et 4°C/∞	

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel STATA version 14.2 (StataCorp). Des statistiques descriptives (moyenne, médiane, fréquence etc.) sont présentées pour décrire les cas et les témoins. Une courbe de Gauss a été faite pour observer la distribution de la variable âge. L'âge n'était pas distribué de façon normale dans notre population, elle a donc été subdivisée en 5 catégories. Ces catégories sont : moins de 25 ans, 25-30 ans, 31-35 ans, 36-40 ans ainsi que 41 ans et plus. La catégorie de référence utilisée pour les analyses était moins de 25 ans. La variable âge a été étudiée en variable continue et en variable catégorielle.

Les données de charge virale et de séquençage ont été obtenues pour les VPH de types 16, 18 et 31. La variable charge virale a été divisée en deux catégories : faible charge virale et haute charge virale. Les valeurs seuils utilisées ont été précédemment décrites comme les valeurs de charge virale qui prédisaient mieux le fait d'avoir une HSIL. Ces valeurs sont respectivement de 0,11 copies par cellule, 0,11 copies par cellule et 0,70 copies par cellule pour VPH16, VPH18 ainsi que VPH31 [204]. Les tests statistiques appropriés ont été utilisés pour les variables continues et catégorielles. Les tests exacts sont inscrits en bas de tableau. Les analyses tenant compte de l'appariement ont été effectuées pour les variables âge, délai, résultats obtenus au HC2 ainsi que les résultats obtenus au LA. Pour les variables de génotypes, la référence qui a été utilisée est la présence de VPH. Ainsi les ratios obtenus étaient des augmentations de risque. Ceci rend l'interprétation des résultats plus aisée. Ainsi, on cherchait l'effet de l'absence de certains génotypes de VPH sur le risque de discordance au moment du traitement.

Des analyses multivariées ont aussi été effectuées, afin d'explorer l'effet indépendant de certaines variables sur le risque de discordance. Des régressions logistiques conditionnelles ont été utilisées pour permettre la prise en compte de l'appariement. Plusieurs régressions logistiques ont été effectuées. Nous avons décidé de conserver les

trois modèles suivants. Pour tous les modèles, les 5 catégories d'âge décrites précédemment ont été utilisées et le groupe de référence était les moins de 25 ans.

(1) Résultat au test HC2 et âge en variable catégorielle

Catégories utilisées pour HC2 : résultat positif (référence) ou résultat négatif au HC2

(2) Résultat au Linear Array (LA) et âge en variable catégorielle

Catégories mutuellement exclusives utilisées pour LA: (a) être infecté par VPH16 (référence), (b) être infecté par un HR-VPH autre que VPH16, (c) être infecté par un LR-VPH ou avoir un résultat négatif

(3) Nombre de type infectant et âge en variable catégorielle

Catégories utilisées : infection multiple (référence) ou infection unique

La variable « nombre de type infectant » a été testée comme variable de confusion et modificateur d'effet avec un résultat VPH16 positif au LA. Elle n'était ni une variable de confusion ni un modificateur d'effet. Nous avons aussi testé la variable âge comme facteur de confusion en comparant les valeurs de rapports de cote brut et ajusté obtenus. Les rapports de cote ont été ajustés pour l'âge en variable catégorielle ainsi que pour l'âge en variable continue. L'âge a aussi été testé comme modificateur d'effet en créant une variable d'interaction. Pour toutes les régressions effectuées, l'âge n'était ni une variable de confusion, ni un modificateur d'effet. Nous avons donc choisi d'utiliser les régressions logistiques incluant l'âge en variable catégorielle puisque cette variable n'était pas distribuée normalement. Les résultats obtenus en utilisant l'âge en variable catégorielle versus variable continue ne variait que minimalement. Une valeur p de moins de 0.05 était considérée comme statistiquement significative.

Résultats

1. Caractéristique des participantes

Notre étude a inclus un total de 710 femmes (355 cas et 355 témoins). Toutes ces femmes avaient obtenu un diagnostic de HSIL et été traitées par excision (LEEP ou conisation au bistouri). Les cas de discordance représentent les femmes ayant une absence de HSIL sur le spécimen prélevé lors du traitement (désigné spécimen de traitement). Les témoins sont les femmes ayant une HSIL sur le spécimen de traitement. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre l'âge des cas et l'âge des témoins (**tableau VI**). La médiane d'âge des cas de discordance est de 31,31 ans avec un écart interquartile (EIQ) s'étalant de 27,02 à 38,27 ans. Les témoins ont un âge médian de 31,26 ans avec un EIQ de 26,65 à 36,62 ans. Le délai en jours entre le moment du diagnostic par colposcopie et le traitement par excision ne diffère pas entre les cas et les témoins. La médiane du délai était de 63 jours (EIQ : 43-98 jours) pour les cas est de 63 jours (EIQ : 42-86 jours) pour les témoins. Ces résultats sont détaillés dans le **tableau VI**.

Tableau VI. Caractéristiques des participantes et des épisodes de soins

	Cas ^a		Témoins ^b		p-value
	n = 355	%	n = 355	%	
Âge					
Variable continue (années)					
Moyenne (DS)	34,03 (9,61)	-	32,94 (8,17)	-	0,275
Médiane	31,31	-	31,26	-	
(EIQ)	(27,02 – 38,27)		(26,65-36,62)		
Variable catégorielle (n, %)					
Moins 25 ans	46	14,33	51	14,45	0,28
25-30 ans	103	32,09	119	33,71	
31-35 ans	61	19,00	86	24,36	
36-40 ans	48	14,95	41	11,61	
41 et plus	63	19,63	56	15,86	
Délai entre diagnostic et traitement (jours)					
Moyenne (DS)	74 (44)	-	72 (55)	-	0,59
Médiane (EI)	63 (43-98)	-	63 (42-86)	-	

^aCas de discordance : absence de HSIL au LEEP/conisation. ^bTémoins : présence de HSIL au LEEP/conisation (i.e. absence de discordance). Les Données manquantes par variable : Âge : 34 cas et 2 témoins; Délai : 2 cas et 1 témoins; Légende : DS : déviation standard; EIQ : Écart interquartile. Test statistique utilisé : Régression logistique conditionnelle

2. Distribution des génotypes de VPH

Le test Hybrid Capture 2 (HC2) est utilisé à des fins de diagnostic. Il permet la détection de 13 types de VPH oncogènes soit les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68. Le test sera occasionnellement positif à cause de la détection d'autres types de HR-VPH ou à risque indéterminé, et parfois même à bas risque, par réaction croisée des sondes génomiques de VPH [205]. Un résultat positif au HC2 suggère la présence d'au moins un des 13 types de haut risque. Ce test ne permet pas de spécifier le nombre de types exacts contenus dans l'échantillon. Pour ce test, nous avons 3 résultats manquants (2 cas et 1 témoin). En utilisant le test HC2, on obtient que 52% (n = 182) des cas de discordance sont infectés par au moins un type de HR-VPH alors que pour les témoins, ce pourcentage atteint 90 % (n = 319) (**tableau VIII**).

Pour 19 femmes (9 cas et 10 témoins), les échantillons requis pour effectuer le LA n'étaient pas disponibles. La recherche de β -globine fut positive pour tous les échantillons

testés. Ils étaient donc tous adéquats. Quatre-vingt une femmes ont obtenu un résultat négatif par le test de génotypage LA (**tableau VII**). De ces femmes, 76 sont des cas de discordance et 5 des témoins. Au total, 610 femmes ont obtenu un résultat positif pour le LA. Il s'agit de 270 cas de discordance et 340 témoins concordants. Parmi les 36 génotypes détectés par le test du LA, le VPH de type 16 est le plus prévalent. On le retrouve dans 26% (n = 91) des cas de discordance et 55% (n = 190) des témoins. Au second rang, nous retrouvons le VPH31 qui est présent chez 12% (n = 41) des cas et 19% (n = 66) des témoins. Le VPH52 se trouve au troisième rang avec une prévalence de 9 % (n = 32) chez nos cas et 14% (n = 50) chez les témoins.

Les génotypes de HR-VPH détectés par LA sont : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68. Parmi les cas, 40 % des femmes (n = 138) sont infectées uniquement par des HR-VPH. Pour les témoins, ce chiffre s'élève à 57% des femmes (n= 198). Les LR-VPH ou de risque indéterminé sont les types : 6, 11, 26, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 et 89. On note que 13% (n = 45) des cas de discordance sont infectées seulement par des LR-VPH. Quant aux témoins, moins de 1% (n = 2) sont uniquement infectés par des LR-VPH.

Les types 26, 40, 69, 71 et 72 ont été chacun retrouvés moins de 10 fois dans notre population. Les VPH11 et VPH34 n'ont pas été détectés dans notre population. Il faut noter qu'une femme peut être infectée par plusieurs types de VPH à la fois. C'est la raison pour laquelle la somme des pourcentages du **tableau VII** excède 100% pour les cas et les témoins.

En utilisant le LA pour déterminer la proportion de femmes infectées par au moins un type de HR-VPH, 65% (n = 225) des cas et 98% (n = 338) des témoins ont eu un résultat positif pour au moins un type de HR-VPH au LA. Le nombre médian de types par femme est de 1 pour les cas comparativement à 2 pour les témoins. Plus de 40% des cas sont infectés par plus d'un type de VPH comparativement à 55% pour les témoins. Ces résultats sont détaillés dans le **tableau VIII**.

Tableau VII. Fréquence des types de VPH au moment du traitement

Type de VPH ^a	Cas		Témoins	
	n = 346	%	n = 345	%
VPH-6	7	2,02	13	3,77
VPH-11	0	0	0	0
VPH-16	91	26,30	190	55,07
VPH-18	18	5,20	27	7,83
VPH-26	2	0,58	1	0,29
VPH-31	41	11,85	66	19,13
VPH-33	12	3,47	37	10,72
VPH-34	0	0	0	0
VPH-35	18	5,20	19	5,51
VPH-39	20	5,64	19	5,51
VPH-40	4	1,16	3	0,87
VPH-42	19	5,49	21	6,09
VPH-44	9	3,18	13	3,77
VPH-45	15	4,34	17	4,93
VPH-51	17	4,91	24	6,96
VPH-52	32	9,25	50	14,49
VPH-53	26	7,51	22	6,38
VPH-54	18	5,20	23	6,67
VPH-56	12	3,47	16	4,64
VPH-58	16	4,62	18	5,22
VPH-59	16	4,62	17	4,93
VPH-61	15	4,34	15	4,35
VPH-62	23	6,65	20	5,80
VPH-66	24	6,94	17	4,93
VPH-67	6	1,73	4	1,16
VPH-68	7	2,02	8	2,32
VPH-69	1	0,29	0	0
VPH-70	4	1,16	12	3,48
VPH-71	0	0	1	0,29
VPH-72	1	0,29	3	0,87
VPH-73	11	3,18	11	3,19
VPH-81	4	1,16	7	2,03
VPH-82	9	2,60	8	2,32
VPH-83	7	2,02	12	3,48
VPH-84	16	4,62	14	4,06
VPH-89	19	5,49	18	5,22
Aucun VPH identifié	76	21,97	5	1,45

^a Tels que déterminées par le test Linear Array; Données manquantes : 9 cas et 10 témoins

Tableau VIII. Présence de génotypes de VPH à haut risque et nombre de génotypes

	Cas		Témoins	
	n = 355	%	n = 355	%
HR-VPH+ selon Hybrid Capture 2^a	182	51,56	319	90,11
HR-VPH+ selon Linear Array	225	65,02	338	97,97
Nombre médian de types	1	-	2	-
Participant avec 0 types	76	21,97	5	1,45
1 type	130	37,57	147	42,61
2 types	67	19,36	88	25,51
3 types	36	10,40	42	12,17
4 types	24	6,94	35	10,14
5 types et +	13	3,76	28	8,12

^aDonnées manquantes au Hybrid Capture : 2 cas et 1 témoin. Données manquantes au Linear Array : 9 cas et 10 témoins. Le test Hybrid Capture identifie sans distinction les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 ; Le Linear Array détecte 36 types de VPH ; 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 et 89. Le groupe des HR-VPH incluent pour notre étude les types : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Test statistique utilisé : McNemmar

3. Association entre le génotype et le risque de discordance

Le **tableau IX** démontre l'association entre le génotype des VPH infectant les patientes au moment du traitement et le risque de discordance. Ce tableau démontre l'augmentation du risque de discordance associée à une absence de VPH au moment du traitement. Un résultat négatif pour HR-VPH par HC2 augmente le risque de discordance (OR : 7,80 ; IC 95% : 4,88-13,12). Une femme n'étant pas infectée par un HR-VPH tel que détecté par HC2 a donc une augmentation du risque de discordance. Elle a plus de risque d'avoir un résultat normal ou de LSIL à l'histologie de traitement qu'une patiente positive par HC2. Lorsque le LA est utilisé pour déterminer l'absence de HR-VPH, l'augmentation de risque de discordance est de plus de 23 fois.

Étudiés individuellement, l'absence de 4 types à haut-risque entraîne une augmentation significative du risque de discordance (**tableau IX**). Il s'agit des types 16, 31, 33 et 52. Le risque de discordance est le plus élevé en l'absence de VPH16. L'absence de VPH33 entraîne la deuxième plus grande augmentation de risque de discordance. Au moment du

traitement, si une femme n'est pas infectée par un de ces 4 types, elle est plus à risque d'avoir un résultat normal ou LSIL à la lecture de l'histologie de traitement. Si ces types sont détectés au moment du traitement, il y a plus de chance que la femme soit réellement traitée pour des HSIL.

Le fait d'être infecté par plusieurs types de VPH comparativement à un seul génotype n'influence pas le risque de discordance. De plus, l'absence ou la présence de LR-VPH n'influence pas non plus significativement le risque de discordance.

Tableau IX. Association entre l'absence de certains génotypes au moment du traitement et la discordance

	OR	95% IC	p-value
HR-VPH+ selon Hybrid Capture 2+ ^a	7,80	4,88- 13,12	<0,01
HR-VPH+ selon Linear Array	23,60	9,83- 74,03	<0,01
Infection unique	1,25	0,89- 1,76	0,18
VPH-6	1,86	0,69- 5,50	0,26
VPH-11	-	-	-
VPH-16	3,48	2,43- 5,07	<0,01
VPH-18	1,53	0,80- 3,00	0,22
VPH-26	0,50	0,01- 9,60	0,56
VPH-31	1,78	1,14- 2,84	0,01
VPH-33	3,08	1,57- 6,49	<0,01
VPH-34	-	-	-
VPH-35	1,06	0,52- 2,13	1,00
VPH-39	0,90	0,45- 1,79	0,87
VPH-40	0,75	0,11- 4,43	1,00
VPH-42	1,11	0,56- 2,23	0,87
VPH-44	1,44	0,57- 3,83	0,52
VPH-45	1,13	0,53- 2,44	0,86
VPH-51	1,47	0,73- 3,04	0,32
VPH-52	1,67	1,01- 2,79	0,03
VPH-53	0,84	0,45- 1,56	0,66
VPH-54	1,23	0,62- 2,49	0,63
VPH-56	1,33	0,59- 3,09	0,57
VPH-58	1,14	0,52- 2,53	0,86
VPH-59	1,07	0,49- 2,32	1,00
VPH-61	1,07	0,48- 2,40	1,00
VPH-62	0,87	0,45- 1,66	0,76
VPH-66	0,68	0,33- 1,38	0,32
VPH-67	0,67	0,14- 2,81	0,75
VPH-68	1,14	0,36- 3,70	1,00
VPH-69	-	-	-
VPH-70	3,67	0,97- 20,47	0,06
VPH-71	-	-	-
VPH-72	3,00	0,24- 157,49	0,62
VPH-73	1,10	0,42- 2,89	1,00
VPH-81	1,75	0,44- 8,15	0,55
VPH-82	0,75	0,21- 2,46	0,79
VPH-83	1,83	0,62- 6,04	0,33
VPH-84	0,87	0,38- 1,95	0,85
VPH-89	0,94	0,46- 1,94	1,00

^a Résultats du test Hybrid Capture 2 (3 valeurs manquantes). Les HR-VPH : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Les LR-VPH sont les types: 6, 11, 26, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89. Les HR-VPH inclu dans le vaccin nonavalent : 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58. Test statistique utilisé : McNemmar

4. Analyse multivariée : l'âge influence-elle l'association entre différents facteurs viraux et la discordance?

Pour étudier d'avantage l'impact du génotype des VPH sur la discordance, nous avons effectué des analyses de régression logistique. Lors de la première analyse, nous avons utilisé comme référence un résultat positif au test Hybrid capture. Une femme ayant obtenu un résultat négatif au test Hybrid capture a environ 8 fois plus de chance d'être discordante (Odds Ratio (OR) ajusté : 7,49; IC 95% 4,63- 12,14) (**tableau X**). Lorsque nous ajustons ce résultat pour l'âge, nous obtenons un OR ajusté identique, soit 7,49 avec un intervalle de confiance à 95% de 4,63- 12,14.

Par la suite, nous avons comparé le fait d'être infecté par un VPH16 au fait d'être (1) infecté par un VPH oncogène autre que le VPH16 et (2) au fait d'être infecté par une LR-VPH ou d'avoir un résultat négatif au LA. Une femme infectée par un VPH oncogène autre que le VPH16 a deux fois plus de risque d'être discordante qu'une femme infectée par le VPH16 (OR : 1,88; IC 95% : 1,27 – 2,76). Lorsqu'une femme est infectée par un LR-VPH ou n'est pas infectée par un VPH (résultat négatif au LA), elle a 32 fois plus de chance d'être discordante qu'une femme infectée par VPH16.

Nous nous sommes aussi demandé si le fait qu'une femme soit infectée par plus d'un type de VPH influence son risque de discordance. Les résultats indiquent que le fait d'avoir une infection unique versus une infection multiple n'influence pas le risque de discordance. Aucun des résultats décrits ci-haut n'ont changé en ajustant pour l'âge.

Tableau X. Association entre différents facteurs viraux et la discordance

	OR brut	IC 95%	OR ajusté ^a	IC 95%
Hybrid capture +	REF	-	REF	-
Hybrid capture -	7,80	(4,90- 12,42)	7,49	(4,63- 12,14)
VPH16	REF	-	REF	-
HR-VPH sans VPH16	1,88	(1,27 – 2,76)	1,88	(1,25 – 2,83)
LR-VPH ou négatif	32,58	(12,94 – 82,02)	31,37	(12,30 – 79,96)
Infection multiple	REF	-	REF	-
Infection unique	1,25	(0,90- 1,74)	1,28	(0,90- 1,81)

^aOR ajusté pour l'âge en variable catégorielle (moins de 25 ans (référence), $\geq 25 - 30$ ans, $\geq 31 - 35$ ans, $\geq 36 - 40$ ans et 41 ans et plus); Données manquantes au HC2 : 2 cas et 1 témoin, Données manquantes au Linear Array : 9 cas et 10 témoins. Test statistique utilisé : Régression logistique multivariées (décrite dans la section analyses statistiques)

5. Association entre la charge virale et le risque de discordance

Nous avons analysé la charge virale mesurée chez les cas et les témoins pour les types 16, 18 et 31. Pour le VPH de type 16, les cas avaient une charge virale maximale de 2 964,37 copies par cellule, minimale de $9,36 \times 10^{-5}$ copies/cellule, médiane de 0,35 copies/cellule et moyenne de 56,24 copies/cellule (SD : 344,05). Les témoins infectés par VPH16 avaient une charge virale maximale de 4 216,25 copies/cellule, minimale de $5,53 \times 10^{-4}$ copies/cellule, médiane de 4,56 copies/cellule et une charge virale moyenne de 119,78 copies/cellule (SD : 479,47).

Pour le VPH18, les cas avaient une charge virale médiane de 0,34 copies/cellule avec un minimum de $4,03 \times 10^{-4}$ copies/cellule et un maximum de 182,42 copies/cellule. La charge virale moyenne des cas était de 18,55 copies/cellule (SD : 45,41). Les témoins avaient une médiane de 0,90 copies/cellule avec un minimum de 1,04 copies/cellule et un maximum de 995,21 copies/cellule. La charge virale moyenne des témoins était de 56,88 copies/cellule (SD : 194,74).

Pour le type 31, la charge virale médiane des cas était de 0,52 copies/cellule. Il y avait un minimum de $2,90 \times 10^{-6}$ copies/cellule et un maximum de 383,38 copies/cellule. La charge virale moyenne des cas était de 25,06 copies/cellule (SD : 73,54)

Les témoins avaient une médiane de 0,75 copies/cellule, un minimum $7,91 \times 10^{-4}$ copies/cellule et un maximum de 673,14 copies/cellule. La charge virale moyenne des témoins était de 37,71 copies/cellule (SD : 124,94).

Ces résultats sont schématisés par la **figure 8**. Par souci de clarté, la **figure 8** montre un box-plot du Log_{10} de la charge virale en fonction du type de VPH infectant les cas et les témoins. Pour les types 16, 18 et 31 les résultats démontrent que la charge virale n'est pas statistiquement différente entre les cas de discordance et les témoins, bien que la moyenne et la médiane des charges virales soient toujours plus élevées pour les témoins que les cas.

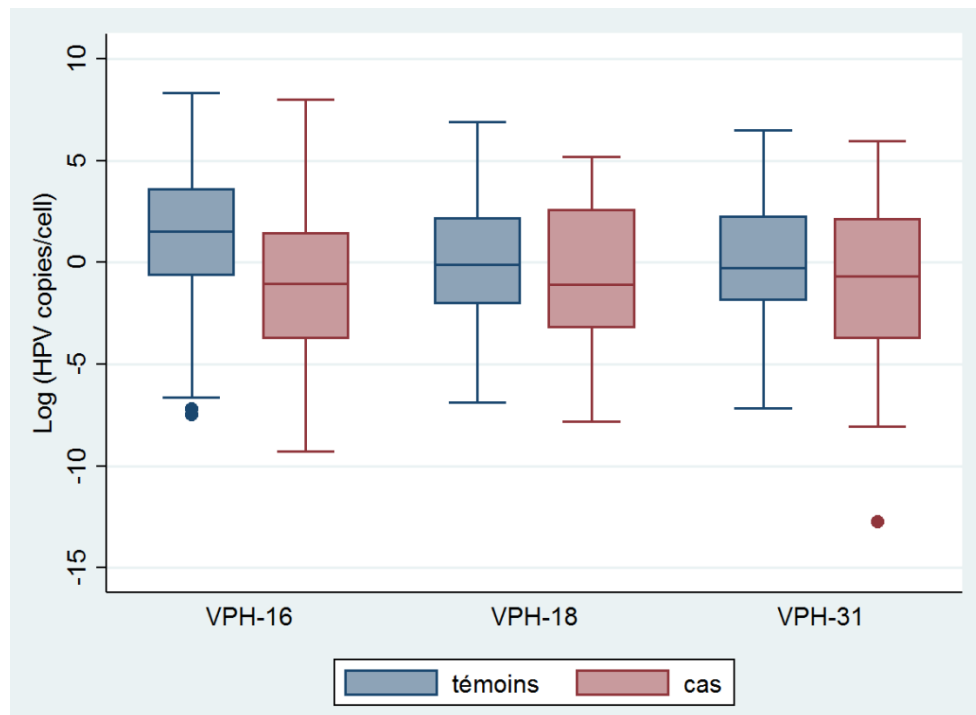


Figure 8. Box-plot de la charge virale pour les types VPH16, VPH18 et VPH31 chez les cas de discordance et les témoins concordants

En établissant un seuil de 0,11 copies par cellule, nous obtenons une différence significative entre la charge virale des cas et celle des témoins pour le VPH16 ($p < 0,01$). Parmi les cas infectés par VPH16, 41% (37/91) avaient une charge virale inférieure ou égale à 0,11 copies par cellule. Quatorze pour cent (27/190) des témoins infectés par VPH16 avaient une charge virale inférieure ou égale à 0,11 copies de VPH par cellule (**tableau XI**).

Cependant, la différence entre les groupes d'une charge virale de plus ou moins 0,11 copies par cellule n'est pas significative pour VPH18 ($p = 0,13$). On note que 39% des cas et 19% des témoins avaient une charge virale supérieure ou égale à 0,11 copies par cellule. Pour VPH31, 56% des cas et 50 % des témoins avaient une charge virale inférieure ou égale à 0,70 copies par cellule. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0,54$).

Tableau XI. Charge virale pour les types 16, 18 et 31

Charge virale (copies/cellule)		Cas		Contrôles		p-value
VPH16		n = 91	%	n = 190	%	
	≤ 0,11	37	40,66	27	14,21	< 0,01
	> 0,11	54	59,34	163	85,79	
VPH18		n = 18		n = 27		
	≤ 0,11	7	38,89	5	18,52	0,13
	> 0,11	11	61,11	22	81,48	
VPH31		n = 41		n = 66		
	≤ 0,70	33	56,10	33	50,50	0,54
	> 0,70	18	43,90	33	50,50	

Test statistique utilisé : chi-carré

6. Polymorphisme de la région du LCR du VPH16

Dans notre groupe à l'étude, 38 variantes différentes du VPH16 ont été identifiées, incluant la variante prototypique. Chaque variante est comparée avec la séquence du prototype. Le prototype utilisé est la première variante du type 16 à avoir été décrite dans

la littérature scientifique. Un total de 281 femmes étaient infectées par VPH16 dans notre population (190 témoins et 91 cas) (**tableau VII**). Les résultats de polymorphisme sont disponibles pour toutes les 281 femmes infectées par VPH16. Les 38 variantes du VPH16 ont été classées en 4 branches phylogénétiques : Européenne, Africaine 1, Africaine 2 et Asiatique-américaine. L'arbre phylogénétique utilisé pour effectuer cette classification est décrit plus bas (**figure 9**).

Dans notre population, la majorité des variations observées sont des variations ponctuelles comparativement au prototype. Quelques délétions de 2 à 105 paires de bases ont été observées (D7803-7804, D783-7839, D7709-7813). Trois des 38 variantes comportaient une délétion et une seule insertion fut observée. Il s'agit d'une insertion de 5 paires de bases à la position 7793 (I7793). Le **tableau XII** détaille les différentes variantes observées ainsi que toutes les variations identifiées pour la région 3' du LCR. Il faut noter qu'une insertion ou une délétion compte pour une seule mutation, bien que plusieurs nucléotides puissent être impliqués. Ainsi le nombre de mutations par variante varie de 0 (prototype) à 11 (variante U34089).

La variante de VPH16 la plus prévalente dans notre population est la variante Sb-2. Cette variante appartient à la branche phylogénétique Européenne. Elle comporte une seule variation à la position 7521. On retrouve cette variante chez 125 de nos 281 participantes VPH16+. La variante prototypique se trouve en seconde position après la Sb-2. Le prototype appartient aussi à la branche européenne. Il est présent dans 100 de nos 281 participantes VPH16+. Les autres variantes sont peu représentées dans notre population comparativement à Sb-2 et au prototype, étant présentes de 1 à 5 fois chacune, lorsque présentes, dans notre population.

La variation la plus fréquente dans notre population de variantes est à la position 7521. Elle est présente dans 29 de nos 38 variantes. Cette variation est suivie de loin par les mutations aux positions 7489, 7764 et 7786. Elles sont toutes les trois présentes chez 9 de nos 38 variantes.

Tableau XII. Polymorphisme du VPH16 dans la région LCR

	Variation des nucléotides par position																																									
VPH16 LCR	7485	7489	7496	7497	7505	7507	7521	7549	7552	7568	7576	7669	7689	7714	7721	7730	7736	7743	7763	7764	7767	7782	7784	7786	7792	7799	7801	7807	7811	7826	7834	7837	7839	D780 3- 7804	I7793	D783 5- 7839	D77 09- 781 3	Nb mutatio ns par variante	Fréq uenc e	Phy n		
Référence	A	G	T	A	C	A	G	C	G	T	A	C	C	T	T	A	A	T	T	C	A	C	C	C	C	G	A	T	G	G	G	A	A	2pb	7pb	5pb	105 pb					
Mutations	C / T	A	C	G	A	C	A	T	A	G	C	T	A	A / G	C	C / T	C	G	G	A	T	C	T	T	T	C / G / A	C	G	T	A	T	C	G	-	-	-	-					
Prototype																																						0	100	I		
AF003035		A					A						A	A						T				T							T								7	1	A	
MTL-16-LCR-02							A	A																																2	1	I
MTL-16-LCR-03	C	A					A					T	A			C		G		T				T															9	3	A	
MTL-16-LCR-06							A																					G												2	1	I
MTL-16-LCR-09	T																																							1	2	I
MTL-16-LCR-10			C				A										C																							3	2	I
MTL-16-LCR-18							A											G																						2	1	I
MTL-16-LCR-39			C				A																																	2	5	I
MTL-16-LCR-41																										C														1	1	I
MTL-16-LCR-42							A																				C													2	2	I
MTL-16-LCR-47																										G														1	1	I
MTL-16-LCR-54																										T														1	3	I
MTL-16-LCR-56							A										C																							2	1	I
MTL-16-LCR-76							A																				C													2	1	I
MTL-16-LCR-77							A								C																									2	1	I
MTL-16-LCR-78	C	A					A					T	A			T				T			T	T							T									10	1	A
MTL-16-LCR-79					A		A																																	2	1	I
MTL-16-LCR-80							A							G					A																					3	1	I
MTL-16-LCR-81							A							G																										2	1	I
MTL-16-LCR-82		A					A						A						T				T								T									6	3	A

	Variation des nucléotides par position																																								
VPH16 LCR	7485	7489	7496	7497	7505	7507	7521	7549	7552	7568	7576	7669	7689	7714	7721	7730	7736	7743	7763	7764	7767	7782	7784	7786	7792	7799	7801	7807	7811	7826	7834	7837	7839	D780 3- 7804	1779 3	D783 5- 7839	D770 9- 7813	Nb mutation s par variante	Fréque- nce		
Référence	A	G	T	A	C	A	G	C	G	T	A	C	C	T	T	A	A	T	T	T	C	A	C	C	C	C	G	A	T	G	G	G	A	A	2 pb	7 pb	5 pb	105 pb			
Mutations	C/ T	A	C	G	A	C	A	T	A	G	C	T	A	A / G	C	C /T	C	G	G	A	T	C	T	T	T	T/G	C / A	C	G	T	A	T	C	G	-	-	-	-			
	SUITE																																								
MTL-16-LCR-83					A		A																			C													3	1	
MTL-16-LCR-84							A																			A														3	1
MTL-16-LCR-85																																			1					1	1
MTL-16-LCR-86	C	A					A					T	A			C					T			T	T						T									10	2
MTL-16-LCR-87							A			G																														2	1
MTL-16-LCR-88	C	A					A					T	A			C		G		T					T										1					10	1
MTL-16-LCR-89							A														C																			2	1
MTL-16-LCR-90																																					1			1	1
MTL-16-LCR-91							A				C																													2	1
MTL-16-LCR-92																							T																	1	1
MTL-16-LCR-93				G																																				1	1
MTL-16-LCR-94							A																													1				2	1
MTL-16-LCR-95	C	A					A					T	A			C		G		T									T											10	1
Sb-2							A																																	1	125
U33068						C	A																																	2	4
U34089	C	A					A					T	A								T									A	T	C	G							11	2
U34099	C	A					A					T									T									A	T	C	G							10	3
Fréquence des mutations	8	9	2	1	2	1	2	9	1	2	1	1	7	8	3	1	5	2	1	3	1	9	1	1	2	9	2	4	1	1	1	2	6	2	2	1	1	1	1		

7. Diversité des variantes du VPH16

Les 38 variantes de VPH16 décrites dans notre population ont été classées en quatre branches phylogénétiques distinctes. La majorité des variantes détectées pour VPH16 appartient à la branche Européenne (264/281). La majorité des femmes infectées par un VPH16, dans notre population, l'est par une variante appartenant à la branche phylogénétique Européenne. La branche Asiatique-Américaine en compte 8/291. Les branches Africaine 1 et Africaine 2 comptent, respectivement, 4/281 et 5/281 spécimens. La **figure 9** illustre l'arbre phylogénétique qui a permis la classification des différentes variantes.

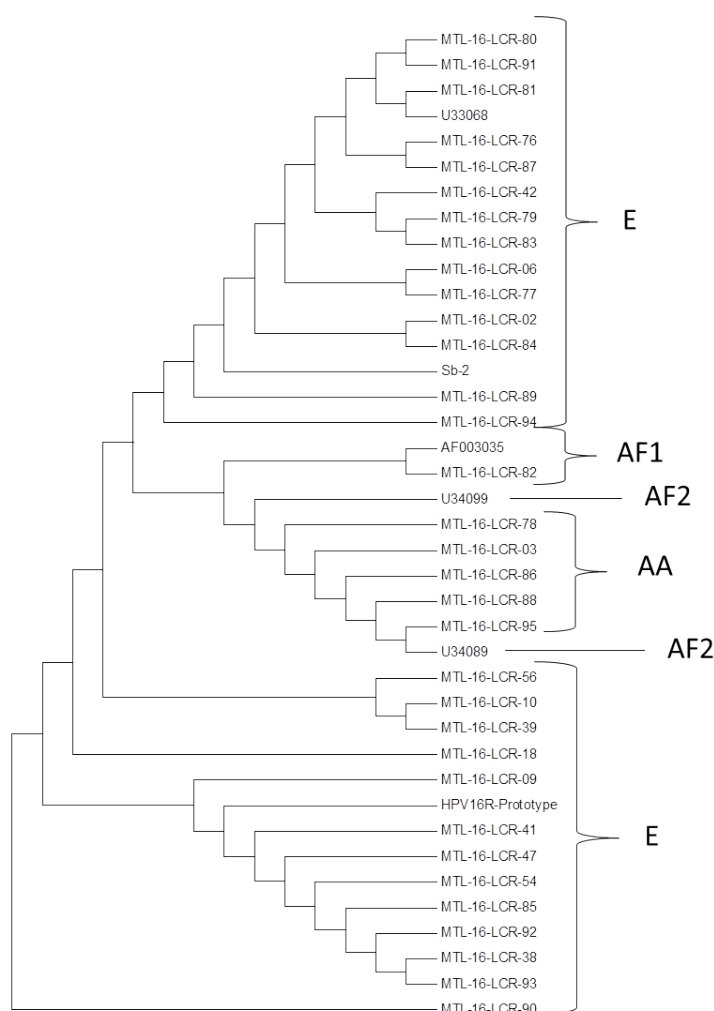


Figure 9. Diversité des variantes du VPH16.Arbre phylogénétique des 38 variantes VPH16 retrouvée dans notre population. L'algorithme neighbor-joining a été utilisé pour construire l'arbre : E : Européenne, AA : Asiatique-Américaine, AF1 : Africaine 1 et AF2 : Africaine 2.

8. Association entre le polymorphisme de la région du LCR de VPH16 et la discordance

En étudiant l'association entre la variante de VPH16 infectant et la discordance, on remarque que la variante prototypique est présente chez 29% de nos cas VPH16+ et chez 39% de nos témoins VPH16+ (**tableau XIII**). La variante la plus prévalente, la Sb-2, est retrouvée dans 49% de nos cas et 42% de nos témoins. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Les variantes prototype-like sont les variantes ayant au plus une seule variation dans la région du LCR comparativement au prototype. Leurs séquences sont donc très similaires à celle du prototype. Les cas comportaient 53% de prototype-like tandis que les témoins en avaient 46%. La différence n'est pas statistiquement significative.

La variation 7521 est la plus souvent retrouvée parmi nos variantes. On remarque que 70% des cas infectés par VPH16 ont la variation 7521. Ce chiffre est de 57% pour les témoins. La différence entre les deux groupes est statistiquement significative ($p = 0,04$). La variation 7521 est donc plus souvent détectée pour les cas VPH16+ comparativement aux témoins VPH16+. L'étude de la mutation 7521 en faisant l'usage du programme TFSEARCH version 1.3 n'a pas permis de démontrer que la mutation entraînerait un gain ou une perte de liaison d'un facteur cellulaire. L'appartenance phylogénétique des variantes ne semble pas influencer la discordance. Par exemple, 92% des cas sont infectés par des variantes Européennes comparativement à 95% chez les témoins ($p = 0,42$). Cette analyse est cependant limitée par le faible nombre de variantes non-européennes et de patientes infectées par des variantes non-européennes.

Tableau XIII. Association entre le polymorphisme du VPH16 et la discordance

Variantes	Cas		Témoins		p-value
	n = 91	%	n = 190	%	
Prototype	26/91	28,57	74/190	38,95	0,09
Sb-2	45/91	49,45	80/190	42,11	0,25
Prototype-like ^a	48/91	52,75	88/190	46,32	0,31
Variation 7521 ^b	62/91	69,66	108/190	56,84	0,04
Européennes ^c	84/91	92,31	180/190	94,74	0,42

^aPrototype-like représente les variantes ayant une seule mutation de différence avec le prototype, ^bVariation 7521; représente tous les spécimens portant la mutation 7521, ^cEuropéennes : comparativement aux variantes Asiatique-américaines, Africaines 1 et Africaines 2 . Test statistique utilisé : chi-carré

9. Polymorphisme de la région du LCR du VPH18

Dans notre population, 45 femmes étaient infectées par le VPH18. Les spécimens de ces 45 femmes ont été séquencés avec succès. Nous avons trouvé 15 différentes variantes du VPH18 (**tableau XIV**). Ces variantes appartiennent aux branches phylogénétiques Européenne, Africaine et Asiatique-Américaine (**figure 10**).

Parmi les variations observées dans la région du LCR, il n'y avait aucune délétion ni insertion. Les différences les plus souvent observées sont les variations aux positions 7670 et 7567. Ces deux variations sont presque universelles dans notre population de femmes infectées par VPH18. La troisième variation la plus souvent retrouvée parmi nos 15 variantes est la variation en position 7529. Elle est présente chez 11 de nos 15 variantes.

Les variantes portaient en général plusieurs variations par rapport au prototype. On retrouve des variantes ayant jusqu'à 15 variations. Une seule variante n'a qu'une variation comparativement au prototype. Il s'agit de la variante NY18-1.

La variante la plus fréquemment retrouvée dans notre population de 45 femmes VPH18+ est la variante prototypique. Elle est présente chez 11 des 45 femmes infectées par VPH18. Elle est suivie par la variante G18-1 qui est présente chez 7 des 45 femmes VPH18+. La troisième variante la plus représentée est la variante B18-2. On la retrouve 6 fois dans notre population.

Deux variations n'avaient pas été décrites précédemment dans la littérature. Il s'agit des mutations se trouvant aux positions des nucléotides 7533 et 7657.

Tableau XIV. Polymorphisme du VPH18 dans la région LCR

	Variation des nucléotides par position																									
VPH18 LCR	7486	7496	7507	7512	7527	7529	7530	7533	7549	7563	7564	7567	7643	7651	7657	7658	7670	7681	7704	7717A	7717B	7726	7730	Nb mutations par variante	Fréquence	Phylogénie
Référence	C	C	A	G	A	C	T	A	C	G	A	A	T	T	T	A	A	T	T	A	A	C	C			
Mutations	T	G	G	A	C	A	C	G	T	A	C	C	G	C	C	C	T	C	C	G	C	T	A			
Prototype																								0	11	AA
B18-2	T					A				A		C					T							5	6	E
FC18-8		G		A			C			A		C	G	C		C	T		C			T	A	12	3	AF
G18-1	T					A						C					T							4	7	E
H18-4	T									A		C					T							4	1	E
NY18-1																					C			1	3	AA
Sc18-2	T					A				A		C					T			G				6	3	E
Sc18-4a			G			A					C	C					T							5	1	E
T18-18b		G		A		A	C		A	A		C	G	C		C	T		C	G		T	A	15	1	AF
T18-8		G		A		A	C			A		C	G	C		C	T		C			T	A	13	2	AF
T18-17		G		A		A	C			A		C	G	C		C	T		C	G		T	A	14	1	AF
T18-9						A						C					T							3	3	E
MTL-18-LCR-28						A		G				C					T	C						5	1	E
1180172				A		A						C			C		T							5	1	AF
807912	T				C	A						C					T							5	1	E
Fréquence des mutations	5	4	1	5	1	11	4	1	1	7	1	13	4	4	1	4	13	1	4	3	1	4	4			

Les mutations en rouge représentent de nouvelles mutations décrites dans notre population, n'étant pas encore décrite dans la littérature.

10. Diversité des variantes du VPH18

L'arbre phylogénétique utilisé pour classer les 15 variantes du VPH18 retrouvées dans notre population est représenté à la **figure 10**. La branche Asiatique-Américaine contient le prototype du VPH18. Cette branche n'est pas la plus représentée dans notre population VPH18+ (14/45). La branche phylogénétique du VPH18 la plus prévalente est la branche Européenne (23/45). Les variantes de la branche Africaine ont été retrouvées 8 fois dans notre population de 45 femmes VPH18+.

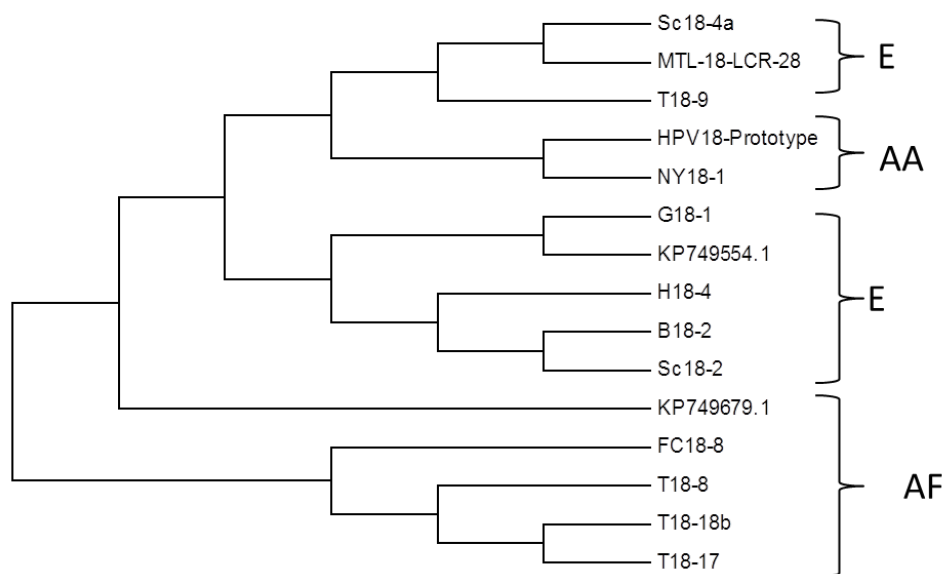


Figure 10. Diversité des variantes du VPH18. Arbre phylogénétique des 15 variantes VPH18 retrouvées dans notre population. L'algorithme neighbor-joining a été utilisé pour construire l'arbre. E : Européenne, AA : Asiatique-Américaine, AF : Africaine

11. Association entre le polymorphisme de la région du LCR du VPH18 et la discordance

La variante prototypique du VPH18 est présente chez 39% des cas de discordance infectés par le VPH18 (7/18). Le prototype est retrouvé chez 15% des témoins VPH18+. Cependant, le nombre de participantes infectées par le VPH18 étant faible, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0,09$). Concernant l'appartenance phylogénétique, elle ne semble pas non plus associée à la discordance. Le fait d'être

infectée par un VPH18+ appartenant à la lignée Européenne ne semble pas influencer le fait d'être un cas de discordance ($p = 0,39$). Il faut cependant noter que les comparaisons effectuées sont faites à partir de petits nombres ce qui limite la puissance de ces analyses (**tableau XV**).

Tableau XV. Association entre le polymorphisme du VPH18 et la discordance

Variantes	Cas		Témoins		p-value
	n = 18	%	n = 27	%	
Prototype	7/18	38,89	4/27	14,81	0,09
Européennes ^a	9/18	50,00	10/27	62,96	0,39

Légende : a : Européennes : Comparativement aux variantes Asiatique-Américaines et Africain. Test statistique utilisé : chi-carré et test exact de fisher

12. Polymorphisme de la région du LCR du VPH31

Dans notre population, 107 femmes étaient infectées par le VPH31. Les spécimens de 10 femmes n'ont pas pu être séquencés. Les résultats concernant le polymorphisme de la région du LCR pour ces 10 femmes (4 cas et 6 témoins) ne sont donc pas disponibles. Les 97 résultats disponibles ont permis la construction d'un arbre phylogénétique. Les variantes trouvées ont été classées selon trois branches : A, B et C (**figure 11**).

Au total, 21 variantes du VPH31 ont été identifiées dans notre population (incluant le prototype). La majorité de ces variantes contenait au moins 12 variations comparativement au prototype (**tableau XVI**). Aucune délétion ni insertion n'a été trouvée dans notre population pour la région séquencée.

Parmi les 21 variantes, la variante la plus prévalente dans notre population est la variante QV05335. Elle est retrouvée chez 29 des 97 femmes VPH31+. Cette variante appartient à la branche phylogénétique B et comporte 12 variations dans la région séquencée du LCR.

La seconde variante la plus fréquente est la QV12357 (18/97), une variante de la branche C. La variante prototypique se classe en troisième position (10/97), elle appartient à la branche A.

Dans notre population, nous avons trouvé 4 variations n'ayant pas été décrites précédemment dans la littérature. Il s'agit des variations se situant aux positions nucléotidiques 7402, 7403, 7418 ainsi que 7485.

Tableau XVI. Polymorphisme du VPH31 dans la région du LCR

	Variation des nucléotides par position																																		
VPH31 LCR	7369	7372	7383a	7383b	7384a	7384b	7387	7394	7402	7403	7418	7449	7450	7457	7474	7485	7506	7508b	7515	7525	7533	7575	7604	7605	7642	7659	7660	7707	7710	7749	7754	7764	Nb mutations par variante	Fréquence*	Phylogé
Référence	T	G	A	A	G	G	G	C	A	A	C	G	A	G	C	C	C	A	C	G	T	T	C	T	C	T	T	A	C	A	C	G			
Mutations	C	C	C	T	C	A	A	A	C	C	T	A	C	A	T	T	T	G	A	A	C	C	T	G	A	G	C	G	T	C	A	A			
Prototype																																	0	13	A
QV00071						A																											1	6	A
MTL-31-LCR-37																								G									1	1	A
MTL-31-LCR-43										C																							1	1	A
IN221709					C									A	T																		3	2	A
MTL-31-LCR-39						A								A	T																		3	1	A
QV05335		C				A	A	A				A	C	A	T		T		A		C								T		A		12	29	B
MTL-31-LCR-12		C				A	A	A				A	C	A	T		T			A		C							T		A		13	3	B
MTL-31-LCR-45		C				A		A			T	A	C	A	T		T			A		C							T		A		13	1	B
MTL-31-LCR-44		C				A		A	C			A	C	A	T	T	T			A		C							T		A		14	1	B
BF363	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C			A					C			14	1	C
MTL-31-LCR-40	C	C		T		A		A				A		A	T				A	A	C	C			A			G		C			15	1	C
HU8029	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C			A			G		C			15	11	C
MTL-31-LCR-38	C	C	C			A		A						A	T			G	A	A	C	C			A			G		C			15	1	C
QV12357	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C			A	G		G		C			16	18	C
MTL-31-LCR-42	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C			A			G		C	A		16	1	C
MTL-31-LCR-36	C	C	C			A		A				A		A	T		T		A	A	C	C			A			G		C			16	1	C
MTL-31-LCR-20	C	C	C			A		A				A		A	T			G	A	A	C	C			A			G		C			16	1	C
HU6788	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C	T		A	G		G		C			17	2	C
MTL-31-LCR-41	C	C		T		A		A				A		A	T				A	A	C	C			A		C	G		C			16	1	C
MTL-31-LCR-46	C	C	C			A		A				A		A	T				A	A	C	C	T		A	G		G		C	A		18	1	C
Fréquence des mutations	11	15	9	2	1	18	1	15	1	1	1	14	4	17	17	1	5	2	11	15	11	15	2	1	11	3	1	10	4	11	4	3			

Les mutations en rouge représentent de nouvelles mutations décrites dans notre population. *10 valeurs manquantes : 10 spécimens n'ont pas réussi à être amplifiés (4 cas et 6 témoins).

13. Diversité des variantes du VPH31

Les 21 variantes retrouvées dans notre population VPH31+ ont été classées dans 3 branches phylogénétiques. La branche C est la plus présente dans notre population. Trente-neuf des 97 spécimens VPH31+ contiennent une variante de cette branche, alors que 34 et 24 spécimens VPH31+ contiennent des variantes de la branche B et de la branche A, respectivement.

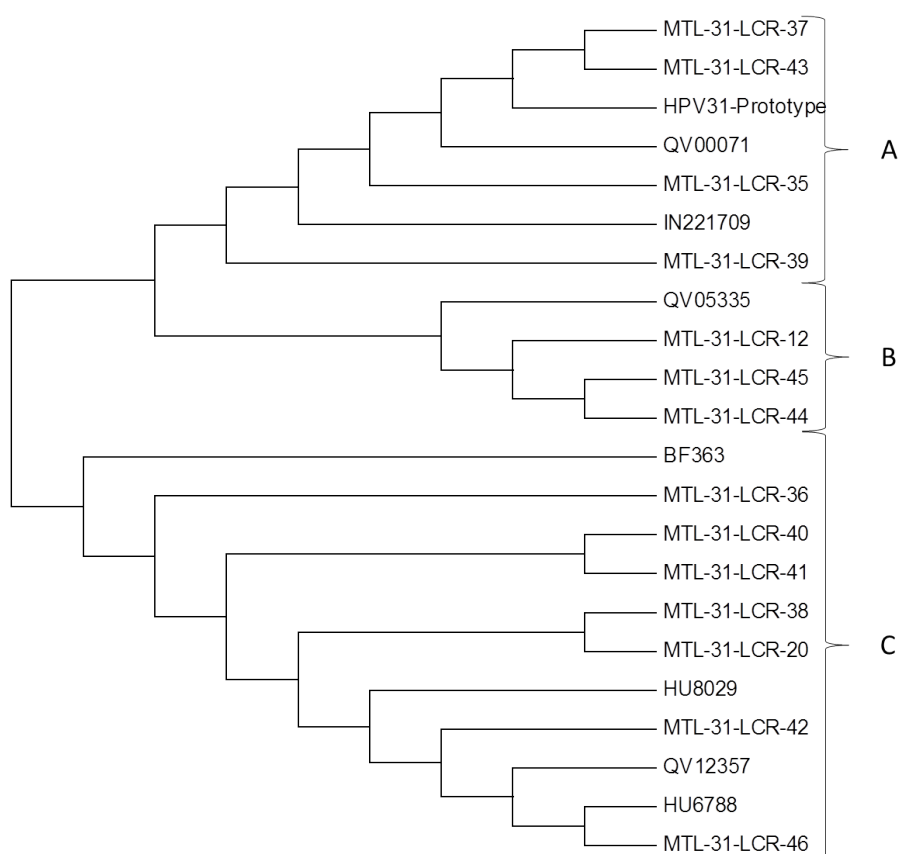


Figure 11. Diversité des variantes du VPH31. Arbre phylogénétique des 21 variantes VPH31 retrouvées dans notre population. L'algorithme neighbor-joining a été utilisé pour construire l'arbre. Légende : A : lignée A, B : lignée B, C : lignée C.

14. Association entre le polymorphisme de la région du LCR du VPH31 et la discordance

La variante prototypique de VPH31 était présente dans 11% (4/37) des cas de discordance et 15% (9/60) des témoins. On observe que les variantes de la lignée A étaient présentes chez 24% (9/37) des cas et 25% (15/60) des témoins. La lignée B est comptée chez 35 % des cas et des témoins. Quant à la lignée C, on la retrouve chez 40% des cas et des témoins. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les cas et les témoins. Le polymorphisme de la région du LCR du VPH31 ne semble pas influencer la discordance (**tableau XVII**).

Tableau XVII. Association entre le polymorphisme du VPH31 et la discordance

Variantes	Cas		Témoins		p-value
	n = 37	%	n = 60	%	
Prototype	4/37	10,81	9/60	15,00	0,56
Lignée A	9/37	24,32	15/60	25,00	0,94
Lignée B	13/37	35,14	21/60	35,00	0,99
Lignée C	15/37	40,54	24/60	40,00	0,96

Test statistique utilisé : chi-carré et test exact de fisher

Discussion

1. Résumé des principaux résultats et comparaison avec la littérature

La proportion de discordance décrite dans la littérature se situe entre 14 à 24 % (voir **tableau III**). Plusieurs auteurs ont utilisé l'absence de dysplasie au traitement par conisation comme issue [12, 13, 16]. Notre étude a utilisé, comme plusieurs auteurs, l'absence de HSIL comme issue [10, 11, 14, 188]. Il n'y a pas de grande variation dans les proportions de discordance définie par les auteurs ayant utilisé l'absence de dysplasie comparativement à ceux ayant utilisés l'absence de HSIL. Nous avons donc défini la discordance comme la présence de LSIL (CIN1) ou la présence d'un épithélium normal au moment du traitement. Les auteurs ayant utilisé l'absence de dysplasie comme issue, n'ont pas inclus les LSIL. Cependant, les LSIL ne sont pas traitées vu la forte probabilité de régression. Notre définition a donc une importance significative sur le plan clinique. Elle permet de maximiser l'identification de femmes potentiellement traitées sans nécessité. Avec notre définition, la proportion de discordance était en moyenne de 17%, ce qui concorde avec les proportions antérieurement décrites.

Nos résultats soutiennent que l'âge n'influence pas le fait d'obtenir un résultat discordant au moment du traitement. Les cas et les témoins n'ont pas un âge significativement différent, avec une médiane de 31 ans pour les deux groupes. Nous avons aussi considéré l'âge comme variable de confusion et modificatrice d'effet dans les régressions logistiques effectuées. Dans toutes les analyses, l'âge n'avait pas un effet statistiquement significatif. Quatre études ont conclu comme nous, que l'âge n'est pas associé à la discordance [11-13, 16]. Une étude récente par Walavalkar et al. a trouvé que les femmes discordantes ont un âge significativement plus élevé que les concordantes [10]. La médiane d'âge était de 36 ans pour les cas de discordance et de 32 ans pour les témoins concordants ($p < 0,001$) [10]. Cependant, les auteurs ont inclus dans leur analyse des femmes qui ont subi une conisation après avoir reçu un résultat anormal à la cytologie (Pap test). Toutes les femmes ayant obtenu un spécimen de traitement négatif n'avaient pas toutes un diagnostic de HSIL préalable. Le fait d'avoir inclus des femmes traitées sur la base de résultat cytologique, pourrait expliquer en partie le fait qu'ils aient obtenu que les femmes discordantes étaient significativement plus âgées. On pourrait postuler que le résultat

cytologique de ces femmes soit plus difficile à interpréter. Comme cette étude a inclu les femmes traitées par conisation sur base de résultats HSIL, ASC-H et LSIL-H à la cytologie, il est possible que les femmes plus âgées se trouvent dans ce groupe traité sur base de cytologie. D'une autre part, Zhang et al. ont conclu que les cas de discordance étaient significativement plus jeunes ($37,0 \pm 8,1$) que les témoins concordants ($39,2 \pm 8,2$) ($p = 0,015$) [188]. Néanmoins, cette différence était petite (2 ans). Cette valeur ne permet donc pas de se baser sur l'âge pour déterminer le risque qu'une femme a d'obtenir un résultat discordant.

Dans notre étude, on observe un délai similaire entre le diagnostic et le traitement pour les cas et les témoins. La médiane du délai est de 2 mois pour les deux groupes. Pour les cas, nous avons obtenu une médiane de 63 jours (EI : 43-98). Pour les témoins, la médiane était de 63 jours (EI : 42-86). Zhang et al. ont conclu qu'un délai plus long entre la biopsie diagnostique et le traitement par conisation augmentait le risque de discordance (OR : 1,397 ; IC 95% : 1,037-1,881 ; $p=0,028$) [188]. Ils ont observé que 21,9% de leurs cas de discordance avaient été traitées après un délai d'un mois. Cette proportion augmente à 25,7% pour un délai de 2 mois, 29% pour un délai de 3 mois et 41% pour un délai de plus de 3 mois. Une force de l'étude de Zhang est le fait qu'une relecture des spécimens de traitement et des biopsies diagnostiques a été faite. Avec cette relecture, les auteurs ont éliminé 42 femmes (9%) qui n'avaient pas réellement de HSIL à la biopsie diagnostique. Malgré cette force et les résultats significatifs, les auteurs eux-mêmes affirment que leurs résultats sont discutables étant donné la faible proportion de femmes traitées après un délai de 3 mois. Un long délai aurait pu favoriser la régression de lésions entre le moment du diagnostic et du traitement. L'étude de Zhang et al. se basait sur une population recrutée dans un seul centre hospitalier. Notre étude a l'avantage d'avoir recruté des participantes dans 10 centres de colposcopie. De plus, notre population est plus importante (710 versus 391). Nous avons aussi quelques femmes traitées après un délai de 3 mois et cependant nous n'avons trouvé aucune différence significative. Une seule autre étude a investigué le délai entre le traitement et le diagnostic. Elle a trouvé comme nous que le délai n'influence pas le risque de discordance ($p=0,254$). Cette étude avait un délai moyen de $53,47 \pm 35,48$ jours [11]. Nous pouvons donc penser que le délai n'affecte pas significativement la discordance. Toutefois, il serait important de continuer la recherche sur cette question.

Plusieurs études ont étudié l'influence du génotype des VPH comme cause possible de discordance. La majorité des études se sont basées uniquement sur le test Hybrid capture 2 pour tirer leurs conclusions. Seules trois études ont utilisé un test de génotypage permettant d'identifier spécifiquement les types infectants [12, 16, 188]. Nos résultats démontrent que l'absence de VPH oncogène, mesuré par HC2, augmente le risque de discordance. Nos cas de discordance avaient significativement moins de résultats positifs au test HC2, 52% comparativement à 90% des témoins qui avaient un résultat positif au HC2. En effectuant une régression logistique, nous avons obtenu que le fait d'obtenir un résultat négatif au HC2 augmente de 7 fois le risque de discordance (OR ajusté : 7,49; IC 95% : 4,63-12,14). Quatre études portant sur la discordance affirment qu'un résultat négatif au HC2, donc l'absence de VPH oncogène, augmente le risque de discordance [10-13]. Aucune étude, à notre connaissance, n'a conclu l'inverse. Un résultat négatif au HC2 permet d'affirmer qu'il y a absence d'au moins 13 types HR-VPH détectables par ce test, incluant les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.

Le LA, pour sa part, permet la détection distincte de 36 types incluant les HR-VPH, à risque indéterminé, et LR-VPH. Les types à risque indéterminé sont les types 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82. Ces types sont des carcinogènes probables. Ils possèdent des évidences limitées pour le cancer du col. Le LA permet aussi la détection des types 34 et 69. Ces types ont été classés comme carcinogènes possibles par analogie avec d'autres types. La définition de HR-VPH utilisée dans cette étude pour le test LA comprend les 14 types inclus dans le consensus international comme étant des HR-VPH et inclus dans les tests diagnostiques actuels. Ces types sont les: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68. Le VPH 66 a récemment été ajouté à la liste de HR-VPH [206]. Selon cette définition, le LA permet la détection des 13 types détectés par HC2 en plus de la détection du type 66. Nos résultats démontrent que, comme avec le test HC2, les cas de discordance sont significativement moins souvent infectés par des HR-VPH. Nous avons obtenu que 65,02% des cas de discordance avaient un résultat positif pour au moins un HR-VPH au LA. Quarante-vingt-dix-huit témoins concordants ont obtenu un résultat positif pour au moins un VPH oncogène au LA. Ne pas avoir d'infection par un VPH oncogène détecté par le LA augmente de 23 fois (IC 95% : 9,83-74,03) le risque de discordance.

Une étude a trouvé que 0,27% (1/3365) des femmes ayant des lésions CIN2/CIN3 ne sont pas infectées par un VPH (résultat négatif au LA) [207]. Dans notre population, 1,45% (5/345) des témoins avait un résultat négatif au LA. Ce chiffre s'élève à 21,97% (76/346) pour les cas de discordance. Nous avons effectué un test GP5-GP6 pour tous les spécimens négatifs au LA. Le GP5-GP6 est un test qui est plus sensible que le LA pour déterminer l'absence d'ADN de VPH. Tous les spécimens initialement négatifs au LA étaient de nouveau négatifs par GP5-GP6. Les femmes obtenant un résultat discordant au moment du traitement sont donc significativement moins souvent infectées par des VPH oncogènes.

On peut remarquer que lorsque l'absence de VPH oncogène est mesurée par HC2, l'augmentation de risque de discordance est de 7,5 fois comparativement à 23 fois lorsqu'elle est mesurée par LA. Trois phénomènes expliquent cette différence. Premièrement, le LA a un seuil de détection plus bas que le HC2 [193]. Il est donc en mesure de détecter l'ADN de VPH à de plus faibles concentrations que le HC2. Deuxièmement, le LA inclut tous les types officiellement reconnus comme HR-VPH, Il inclut donc 14 types comparativement à 13 pour le HC2. HC2 peut détecter la présence de VPH66 mais de façon moins sensible car cette détection résulte d'une réaction d'hybridation croisée avec les sondes des autres types oncogènes (voir plus bas). De plus, les résultats obtenus au HC2 sont moins précis à cause des réactions croisées avec d'autres types (haut et bas risque). Plusieurs auteurs ont décrit qu'un résultat HC2 pouvait être positif en l'absence des 13 types qu'il cible [197-202]. Les femmes infectées par un VPH non ciblé par HC2 peuvent donc obtenir un résultat positif au HC2 à cause de ces réactions croisées. Parmi les femmes infectées par un seul VPH oncogène non ciblé par le HC2, les types 66, 67, 70 et 82 sont les plus susceptibles d'engendrer un résultat positif. Une étude récente décrit que 80% des femmes infectées par seulement le VPH 82 obtiennent un résultat positif au HC2. Ce chiffre est de 60%, 59% et 56% respectivement pour les types 66, 70 et 67. Il est possible qu'une femme n'ayant pas de HR-VPH obtienne un résultat positif au HC2. Il a été estimé que 7.8% de tous les résultats positifs au HC2 est dû à une réaction croisée avec LR-VPH non ciblé par HC2 [205]. Malgré la présence de réaction croisée, un résultat positif au HC2 indiquerait un risque moindre d'être discordante.

Les trois types de VPH les plus prévalents dans notre population d'étude sont les VPH 16, 31 et 52. Ces types sont inclus parmi les 5 types les plus prévalent dans les HSIL et les cancers, tel que décrit par Serrano et Munoz dans une grande étude internationale. Cette étude rapporte en ordre décroissant de contribution aux cancers du col les types 16, 18, 31, 33, 45, 52 et 58 [208]. La distribution des types varie lorsque nous considérons des lésions précancéreuses et non des cancers invasifs. Coutlée et al. ont décrit la distribution des 36 types de VPH inclus dans le LA chez des femmes canadiennes ayant des lésions CIN1, CIN2, CIN3 et des cancers invasifs [207]. Ils ont trouvé que pour les femmes CIN2/CIN3, 57,62 % (210,3/365) étaient infectées par VPH16. Le VPH18 était présent chez 7,59% (27,7/365) des femmes ayant des lésions CIN2/CIN3, tandis que le VPH31 était retrouvé chez 10,47% (38,2/365). La distribution de ces types est similaire à la distribution retrouvée dans notre population de témoins (femmes concordantes). Nos témoins avaient une proportion de 55,07% pour le VPH16, de 7,83% pour VPH18 et de 19,17% pour VPH31. Pour les cas de discordance, on note une présence de VPH16 chez 26,30%, de 5,20% pour VPH18 et de 11,85% pour VPH31. On remarque que pour le VPH16 et le VPH18, les témoins ont une prévalence similaire à celle retrouvée par Coutlée et al. tandis que pour les cas de discordance, ces valeurs sont plus basses. Pour le VPH31, la prévalence dans notre population est plus haute. Elle reste malgré tout toujours plus présente chez les témoins concordants. Ceci nous mène à croire que les proportions de VPH oncogènes chez les cas de discordance sont particulièrement basses.

Nos résultats d'analyse individuelle des génotypes démontrent que les types 16, 31, 33 et 52 sont significativement associés à la discordance. L'absence de ces types favorise la discordance. L'absence de VPH16 est celle qui augmente le plus le risque de discordance. Elle entraîne une augmentation de risque de 3,48 fois (IC 95% : 2,43-5,07) (p-value <0,001). Une femme non infectée par VPH16 au moment du traitement a trois fois plus de risque d'obtenir un résultat discordant. Ces résultats concordent avec le fait que le VPH16 est responsable de la majorité des cancers du col [121]. Nous avons effectué une régression logistique en utilisant la présence de VPH16 comme référence. Nous avons trouvé que le fait d'être infecté par un VPH oncogène autre que VPH16 augmente de 1,88 fois (IC 95% 1,25-2,83) le risque de discordance. Lorsqu'on compare une femme infectée par VPH16 au moment du traitement à une femme infectée par un LR-VPH ou ayant un résultat négatif au LA, la seconde femme a 31 fois (IC

95% : 12,30-79,96) plus de risque d'obtenir un résultat discordant. Trois études ont effectué une analyse individuelle des génotypes. Zhang et al. ont comparé des femmes infectées par le VPH16 à des femmes avec un autre statut infectieux pour les VPH (infectée par d'autres types à haut risque, par des types à bas risque ou non infectée) [188]. Ils ont conclu qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative ($p=0,489$). Ces résultats divergent avec les nôtres. Ceci pourrait s'expliquer par le grand nombre de valeurs manquantes pour la variable génotype retrouvé dans cette étude. En effet, cette étude est rétrospective et pour 20% (81/391) des femmes, les génotypes n'étaient pas disponibles [188]. Il est donc probable que les résultats obtenus par Zhang et al. pour la variable génotype soient biaisés. Deux autres auteurs se sont penchés sur le génotype spécifique dans la discordance. Ryu et al. ont trouvé en 2010 que le fait d'être infecté par VPH16 comparativement à un autre statut infectieux pour les VPH n'était pas significativement associé à la discordance ($p=0,221$) [16]. Cette étude a recruté 192 femmes traitées par conisation sur la base d'un diagnostic colposcopique de HSIL dans l'hôpital universitaire de Bucheon en Corée entre 2003 et 2005. Nam et al. ont trouvé en 2015 que le fait d'être infecté par VPH16 comparativement à un autre statut infectieux pour les VPH est significativement associé à la discordance. Nam et al. ont conclu que l'absence de VPH16 augmente le risque de discordance, même lorsque comparé à tout autre statut infection pour les VPH confondus ($p=0,026$) [12]. Nam et al. ont recruté 673 femmes entre 2001 et 2010 dans le même centre hospitalier que Ryu et al. Par ailleurs, le Dr Ryu est aussi auteur dans l'article de Nam et al. Ceci laisse croire que le résultat obtenu en 2010 par Ryu était dû à une population d'étude trop petite. En 2015, l'équipe de recherche concluait que l'absence de VPH16 augmentait significativement le risque de discordance.

Dans notre population, le fait d'être infecté par plus d'un type de VPH n'influence pas le risque de discordance. Parmi nos cas de discordance, 37,57 % (130/355) sont infectés par un seul type de VPH. Ce chiffre est de 42,61% (147/355) pour les témoins. Le nombre de type médian infectant les cas de discordance est de 1 tandis qu'il est de deux pour les témoins (tableau VIII). En général, les témoins sont infectés par plus de types que les cas de discordances. Ceci est dû au fait que 22% des cas ne sont pas infectés par un VPH. Nos résultats démontrent que le fait d'avoir plus d'un type de VPH n'influence pas la discordance (OR ajusté pour l'âge : 1,28, IC 95% : 0,9-1,81). Parmi les études portant sur la discordance, une seule a investigué le rôle

du nombre de types infectant. Zhang et al. ont trouvé que le fait d'être infecté par un type oncogène versus plusieurs types oncogène n'influence pas le risque de discordance ($p=0,204$). Ces résultats concordent avec les nôtres. Une étude a décrit qu'une proportion de 34,99% de femmes ayant un diagnostic de CIN2/CIN3 sont infectées par un seul type de VPH [207]. Pour nos cas et nos témoins, les proportions de femmes infectées ne sont pas beaucoup plus élevées que 35 %.

Nos analyses indiquent que la charge virale n'est pas un bon prédicteur de discordance. En variable continue, le VPH16 se trouvait près du seuil de signification. Le VPH18 et le VPH31 cependant, ne l'étaient pas. En général, la charge virale semble plus élevée chez les témoins. L'association entre la charge virale et la sévérité des lésions est complexe. Une charge virale forte pourrait indiquer un haut taux de réplication virale, donc une infection active, ou un nombre élevé de cellules infectées par le VPH16. Une faible charge virale pourrait indiquer une infection en voie d'éradication par le système immunitaire, une infection latente ou une intégration du génome viral dans les cellules de l'hôte. Toujours est-il que l'intégration du génome viral est un indicatif de progression vers un état invasif. Il est donc difficile de conclure avec certitude ce que signifie une charge virale forte ou faible. Une étude a démontré qu'une charge virale élevée chez des femmes infectées par VPH16 est associée à une progression de lésions cervicales [130]. Hesselink et al. ont trouvé qu'une haute charge virale était significativement associée au fait d'avoir une lésion CIN2 ou plus sévère (CIN3 etc.). Ils trouvèrent que pour VPH16 et 18, le seuil de charge virale qui démontrait une meilleure corrélation avec les HSIL était de 0,11 copies/cellules. Une charge virale supérieure à 0,11 prédisait bien le fait d'avoir des lésions précancéreuses (CIN2 et +). Pour le type 31, une charge virale de plus de 0,70 copies/cellule était corrélée à une HSIL [204]. En utilisant ces seuils, nous avons obtenu qu'une faible charge virale pour VPH16 augmente le risque de discordance ($p<0.001$). Même en utilisant un seuil au lieu des valeurs brutes, les résultats n'étaient pas significatifs pour une faible charge virale pour VPH18 et VPH31.

Trois études récentes ont conclu qu'une faible charge virale augmente le risque de discordance [12, 13, 16]. Ces études ont investigué la charge virale grâce à une mesure semi-quantitative : le RLU (Relative Light Unit) obtenue grâce au test HC2. Deux études ont observé

une augmentation du risque de près de 3 à 5 fois chez les femmes ayant une charge virale inférieure à 100 RLU [12, 16]. Rodriguez-Manfredi et al. ont établi le seuil à 10 RLU et a obtenu une augmentation d'environ 3 fois le risque de discordance ($p=0,023$). Ils ont basé le choix du seuil sur plusieurs études ayant démontré qu'une charge virale de plus de 10 RLU augmentait significativement le risque de développer des HSIL [209-212].

La charge virale mesurée par HC2 permet de quantifier la quantité de plusieurs types oncogènes infectant la patiente sans considérer cependant la cellularité du spécimen. Il est même possible de prendre en compte certains types de bas-risque avec lesquels il y aurait une réaction croisée [205]. Tandis qu'en étudiant la charge virale avec un PCR en temps réel, comme nous l'avons fait, nous n'avons pas pris en compte la combinaison des types et avons ajusté pour la cellularité du spécimen. Effectivement, une femme pourrait être infectée par plusieurs types. Chaque type pourrait contribuer ainsi à augmenter la charge virale totale. Il serait intéressant d'effectuer une analyse de la charge virale en tenant compte de tous les types détectés par le LA. Ceci permettrait d'obtenir une mesure quantitative qui serait plus adéquate. Ces résultats pourraient être comparés à ceux obtenus par HC2 (RLU) pour vérifier l'association entre la charge virale et la discordance. Une étude a défini une corrélation statistiquement significative de $r = 0,70$ entre la charge virale mesurée par HC2 et celle mesurée en PCR en temps réel [193]. Il serait aussi intéressant d'établir un seuil qui aurait une signification clinique. Un seuil qui permettrait d'affirmer qu'il y ait une augmentation ou une diminution du risque de discordance. Un tel seuil faciliterait aussi la recherche et permettrait une meilleure comparaison des résultats. Même si nos résultats ne sont pas significatifs pour tous les 3 types étudiés, les cas de discordance ont en général une charge virale plus faible. Les résultats obtenus pour VPH16 avec le seuil à 0,11 copies/cellule nous mène à croire qu'un tel seuil pourrait exister. Nous avons une population VPH16+ de 281 femmes (91 cas et 290 témoins). Ce qui pourrait expliquer le fait que nous n'avons pas obtenu de résultat significatif pour VPH18 ou VPH31. Nous avons un effectif de 45 femmes (18 cas et 27 témoins) pour VPH18. Cent-sept femmes étaient infectées par VPH31 (41 cas et 66 témoins). Il serait possible qu'avec un échantillon plus grand, nous obtenions des résultats statistiquement significatifs. De plus, en tenant compte de tous les types infectant, nous pourrions obtenir une charge virale globale pour chaque femme. Cette mesure pourrait s'avérer plus précise pour obtenir un seuil cliniquement significatif.

Selon nos résultats, le polymorphisme n'est pas un bon indicateur de la discordance. Nous avons utilisé la région la plus variable du génome des VPH et la plus étudiée. En ce sens, le LCR est le meilleur choix de région à séquencer. Une autre possibilité aurait été d'effectuer une analyse du génome complet. Une analyse du génome viral intégral aurait permis de détecter plus de mutations. Aussi, il aurait été possible d'effectuer des associations entre les mutations dans différentes régions du génome viral. Les régions E6 et E7, reconnues pour leur pouvoir oncogène, aurait aussi pu être étudiées. Dans le cadre de la présente étude, nous n'avions pas les ressources financières requises pour entreprendre l'analyse du génome intégral. Une mutation dans une région clé du génome viral pourrait conférer une capacité oncogénique plus forte ou plus réduite à un virus. Cette mutation aurait pu avoir lieu dans une portion codante ou une région régulatrice du génome viral. Une analyse tenant compte du génome intégral des VPH permettrait de vérifier la présence d'autres mutations ou motifs de mutations qui pourraient avoir un impact sur la discordance.

2. Forces et limites

Toutes nos participantes sont issues de l'essai contrôlé randomisé CoHIPP. CoHIPP contient un échantillon de femmes représentatif des femmes subissant une colposcopie au Canada. Premièrement, parce que l'étude CoHIPP a effectué un recrutement dans 13 centres de colposcopie à travers le Canada, dont 10 ont accepté de participer à l'étude de la discordance. La liste des centres de colposcopies inclus dans CoHIPP est décrite en annexe (annexe 1). Ainsi, le recrutement a pris en compte les variabilités au niveau des différents centres en matière de temps d'attente et de prise en charge. De plus, les femmes ont été sélectionnées comme elles l'auraient été dans un contexte clinique, c'est-à-dire en respectant les contraindications du traitement. Tous les critères d'exclusions visaient à éliminer les femmes qui, en temps normal, n'auraient pas reçu un traitement de conisation. Nous croyons donc que nos résultats peuvent être généralisés à l'ensemble des femmes canadiennes subissant un traitement pour lésions par conisation pour des lésions précancéreuses.

Nos 355 cas et 355 témoins provenaient de 10 centres de colposcopies. Ils étaient appariés selon le centre de colposcopie et le moment du recrutement (à l'intérieur de 3 mois du recrutement du cas). La prévalence de discordance varie parfois grandement d'un centre à un (0-40%). L'appariement selon le centre permis donc d'éliminer un facteur de risque qui semble important. Les méthodes de prises en charge peuvent varier rapidement. Il peut y avoir des changements de politique de prise en charge ou à l'incorporation de nouvelles méthodes de prévention (par exemple la vaccination). L'appariement selon le moment du recrutement permet de réduire le biais qui serait dû à une prise en charge différente des participantes. Nous nous sommes donc ainsi assurés que les cas et les témoins avaient reçu une prise en charge similaire, soit dans la même clinique et dans un intervalle de temps court. En utilisant le centre et le temps de calendrier comme variables d'appariement, nous avons éliminé la confusion qui aurait pu être associée à la prise en charge.

Une limite de notre étude est le fait que, pour certaines variables, le nombre d'observation était trop petit pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

3. Contrôle de biais et confusion

De nombreuses mesures ont été prises dans cette étude pour minimiser les biais. Premièrement, le biais de sélection a été éliminé par nos critères d'exclusions visant à éliminer les femmes qui n'auraient pas subi de traitement par conisation en temps normal. Le fait que notre population soit tirée de plusieurs centres de colposcopies à travers le Canada diminue aussi le risque de biais de sélection.

Les biais d'information liés à la définition des cas et des témoins ont été minimisés par une vérification rigoureuse des dossiers des participantes. Pour toutes les participantes pour lesquelles les valeurs observées semblaient aberrantes ou inexacts, le dossier médical a été révisé par deux personnes. Toutefois, nous n'avons pas effectué de relecture des résultats obtenus à la biopsie diagnostique ayant menée au traitement ni aux résultats de spécimen de traitement. La discordance pourrait être due soit à une erreur de lecture à la biopsie diagnostique ou à l'histologie de traitement. Idéalement, cette lecture aurait été faite par au moins deux

pathologistes expérimentés, indépendants de l'étude et à l'aveugle. Ces vérifications permettraient de réduire au maximum la possibilité que la discordance observée soit due à une erreur de lecture. Le cas advenant, il pourrait y avoir un biais de classification non différentiel. Les conclusions tirées pourraient alors être des sous-estimations des valeurs réelles. Une étude ayant effectué les relectures de biopsies et de cônes obtenus au traitement a dû reclasser 14 % (3/21) de leurs lésions de haut grade (HSIL) en lésions de bas grade (LSIL). Ils ont aussi diminué la classification de 24 % (24/100) des biopsies CIN2 et 83% (5/6) des ASC-H ainsi que 92 % (12/13) des LSIL-H. Malgré les reclassifications, ces auteurs sont parvenus aux mêmes conclusions que notre étude exceptée pour la variable âge [10]. En outre, les femmes ayant obtenu un résultat négatif au moment du traitement ont été suivies par leurs médecins. Nous savons qu'elles n'ont pas développé de HSIL par la suite. Ceci nous rassure sur la validité de la lecture au moment du traitement. La vérification des lames est en train d'être effectuée et, lorsqu'elle sera terminée, permettra d'ajuster les résultats en conséquence.

Les biais d'information reliés aux mesures d'exposition ont été minimisés par des techniques de laboratoire minutieuses. Toutes les tests de laboratoire ont été effectuées dans un laboratoire certifié. De plus, toutes les entrées de résultats ont été vérifiées à deux reprises. Les personnes effectuant les analyses en laboratoire étaient toutes à l'aveugle. Par ailleurs, tous les spécimens ont été traités selon le même protocole. En prenant cette précaution, nous avons diminué la possibilité des biais.

Dans notre étude, nous n'avons pas tenu compte la vaccination des participantes. Étant donné le moment d'implantation de la vaccination et la population de jeunes femmes visées, il y a une faible proportion de participantes vaccinées (seulement 10 % des femmes). Ces femmes n'ont pas subi de test VPH avant l'étude. Le test VPH a été fait dans l'étude pour toutes les femmes incluses. Les données disponibles pour le vaccin démontrent qu'il est très efficace pour les types qu'il cible [213].

4. Perspectives futures

Le test HC2 est un test approuvé pour le dépistage du cancer du col en utilisation conjointe avec le Pap test. Pour sa part, le LA n'est pas approuvé le dépistage, mais permet de déterminer avec plus de précision si une femme est infectée par un VPH oncogène que le HC2. Le LA est beaucoup plus long à exécuter et plus dispendieux que le HC2. Une étude a comparé la performance du LA et du HC2 parmi des femmes ayant un résultat Pap ASC-US (atypie des cellules épithéliales indéterminée). Les auteurs ont conclu que, pour l'identification de CIN3, le LA et le HC2 avaient une performance similaire. Cette étude note aussi qu'on obtient plus souvent un résultat positif au LA en présence d'un VPH oncogène, ce qui n'empêche pas que la performance des deux tests soit similaire [214]. En se basant sur ces affirmations et le fait que le HC2 soit déjà approuvé et utilisé en clinique des recommandations supplémentaires devraient inclure le HC2 et non le LA. Étant donné que les deux tests permettent d'obtenir des résultats fortement significatifs ($p\text{-value} < 0.001$), l'usage du test HC2 semble plus appropriée pour réduire le risque de discordance en clinique. De nombreux auteurs proposent déjà l'implantation du test de VPH dans le dépistage du cancer du col chez les femmes de plus de 30 ans [215]. Les nouveaux tests de dépistage du cancer par la détection de VPH permettent non seulement de détecter la présence de HR-VPH mais permettent de déterminer si il y a présence spécifiquement des génotypes 16 et 18.

Les résultats de charges virales sont équivoques. Ils ne peuvent pas, à ce stade, être utilisés pour déterminer le risque de discordance. Le séquençage de la région LCR du génome des VPH ne devrait pas non plus être utilisé pour estimer le risque de discordance. Cependant, une étude analysant le génome complet pourrait permettre de détecter des mutations ou des motifs de mutations jouant un rôle dans la discordance. Avec la littérature présente, aucune recommandation ne peut être faite pour l'usage du séquençage ou de la charge virale dans un contexte clinique. D'ailleurs, ces tests étant coûteux et long à effectuer, leur utilisation en clinique ne semble pas envisageable.

Notre étude s'est concentrée sur des causes virologiques pouvant expliquer la discordance. Il est pertinent d'investiguer les caractéristiques cliniques associées à la

discordance. En plus du délai, notre équipe de recherche a investigué les différents résultats obtenus par les participantes ayant menés au traitement. Ainsi, les résultats obtenus au test Pap, les résultats obtenus lors de la biopsie diagnostique, l'usage de contraceptif oraux, et le tabagisme, sont toutes des variables qui ont été étudiées par notre équipe de recherche. Ces résultats n'ont pas été inclus dans le présent mémoire. Ultérieurement, nous pourrions vérifier que l'absence de HSIL n'est pas due à un mauvais prélèvement au moment du traitement. Dans un tel cas, la femme pourrait rester avec des lésions précancéreuses non traitées. Ce qui pourrait s'avérer dangereux pour sa santé. Notre suivi des patientes avec discordance ne supporte toutefois pas cette possibilité.

L'étude CoHIPP a permis de décrire des pourcentages de discordances allant de 0 à 40% dépendant des centres de colposcopie. Il serait intéressant d'investiguer les différences de prise en charge dans ces centres. Ces différences, si trouvées significatives, pourraient permettre de diminuer les risques de traitement non nécessaires. L'Organisation Mondiale de la Santé a un programme de formation standardisé [160]. Aussi, une banque de lames histologiques est mise à la disponibilité des professionnels de la santé à des fins de formation. Ces outils ont pour but d'uniformiser la prise en charge des lésions précancéreuses. Ils pourraient être utilisés pour parfaire la formation des professionnels. Ou encore, ces résultats pourraient révéler une faille dans le système de classification actuel et mener à un changement permettant de diminuer au maximum le traitement inutile.

Conclusion

À l'échelle canadienne, les femmes de 25 à 34 ans ont la plus haute prévalence de grossesses [187]. La majorité des participantes de la présente étude correspondent à ce groupe d'âge. Il est donc d'une grande importance de limiter les conséquences sur les grossesses futures de ces femmes. Il est important de rappeler que le traitement par conisation est associé à des issues de grossesses négatives. La majorité des femmes subissant un traitement ne développeraient pas le cancer du col de l'utérus, et ce, même sans traitement. Il est donc capital de s'assurer que les méthodes préventives n'engendrent pas de conséquences néfastes qui pourraient être évitées. Les conclusions tirées dans la présente étude indiquent qu'on pourrait envisager un test HC2 avant le traitement par conisation de femmes ayant un désir de procréation. Si avec le diagnostic de lésion précancéreuse une femme obtenait un résultat négatif au test HC2, un suivi adéquat et une seconde biopsie diagnostique pourrait être effectués. Le suivi ou la biopsie permettrait de vérifier la nécessité d'effectuer un traitement. Des études futures pourraient permettre de vérifier la faisabilité et l'efficacité de cette proposition.

Bibliographie

1. Ferlay, J., et al. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11*. 2012 [cited 2016 03]; 18]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
3. Franco, E.L., E. Duarte-Franco, and A. Ferenczy, *Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection*. CMAJ, 2001. **164**(7): p. 1017-25.
4. Bosch, F.X., et al., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. J Clin Pathol, 2002. **55**(4): p. 244-65.
5. zur Hausen, H., *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1288**(2): p. F55-78.
6. Castle, P.E., *Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer*. J Low Genit Tract Dis, 2004. **8**(3): p. 224-30.
7. Sellors, J.W. and R. Sankaranarayanan, *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner's Manual*. 2003.
8. Jin, G., et al., *Pregnancy outcome following loop electrosurgical excision procedure (LEEP) a systematic review and meta-analysis*. Arch Gynecol Obstet, 2014. **289**(1): p. 85-99.
9. Crane, J.M., *Pregnancy outcome after loop electrosurgical excision procedure: a systematic review*. Obstet Gynecol, 2003. **102**(5 Pt 1): p. 1058-62.
10. Walavalkar, V., et al., *Absence or Presence of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion in Cervical Conization Specimens: A Clinicopathologic Study of 540 Cases*. Am J Clin Pathol, 2016. **145**(1): p. 96-100.
11. Giannella, L., et al., *High-grade CIN on cervical biopsy and predictors of the subsequent cone histology results in women undergoing immediate conization*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015. **186**: p. 68-74.
12. Nam, K., et al., *Clinical significance of a negative loop electrosurgical excision procedure biopsy in patients with biopsy-confirmed high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. J Low Genit Tract Dis, 2015. **19**(2): p. 103-9.
13. Rodriguez-Manfredi, A., et al., *Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen*. Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 271-6.
14. Witt, B.L., et al., *Negative loop electrosurgical cone biopsy finding following a biopsy diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesion: frequency and clinical significance*. Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(10): p. 1259-61.
15. Li, Z.G., et al., *Three-step versus "see-and-treat" approach in women with high-grade squamous intraepithelial lesions in a low-resource country*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **106**(3): p. 202-5.
16. Ryu, A., et al., *Absence of dysplasia in the excised cervix by a loop electrosurgical excision procedure in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia*. J Gynecol Oncol, 2010. **21**(2): p. 87-92.

17. Murta, E.F., A.O. Silva, and E.A. Silva, *Clinical significance of a negative loop electrosurgical excision procedure, conization and hysterectomy for cervical intraepithelial neoplasia*. Eur J Gynaecol Oncol, 2006. **27**(1): p. 50-2.
18. Bernard, H.U., I.E. Calleja-Macias, and S.T. Dunn, *Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications*. Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1071-6.
19. Handisurya, A., C. Schellenbacher, and R. Kirnbauer, *Diseases caused by human papillomaviruses (HPV)*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **7**(5): p. 453-66; quiz 466, 467.
20. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-72.
21. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 2286-302.
22. Munger, K. and P.M. Howley, *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. Virus Res, 2002. **89**(2): p. 213-28.
23. Yang, L., et al., *The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5086-90.
24. Egawa, N., et al., *Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3863-90.
25. Nishimura, A., et al., *Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3752-60.
26. Valle, G.F. and L. Banks, *The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 5): p. 1239-45.
27. Ashrafi, G.H., et al., *E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain*. Int J Cancer, 2006. **119**(9): p. 2105-12.
28. Howie, H.L., R.A. Katzenellenbogen, and D.A. Galloway, *Papillomavirus E6 proteins*. Virology, 2009. **384**(2): p. 324-34.
29. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *The human papillomavirus E7 oncoprotein*. Virology, 2009. **384**(2): p. 335-44.
30. Barrow-Laing, L., W. Chen, and A. Roman, *Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently*. Virology, 2010. **400**(2): p. 233-9.
31. Stubenrauch, F., et al., *The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1178-86.
32. Han, R., et al., *Characterization of transformation function of cottontail rabbit papillomavirus E5 and E8 genes*. Virology, 1998. **251**(2): p. 253-63.
33. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
34. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
35. Bernard, H.U., *The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S1-6.
36. Rebrikov, D.V., et al., *[A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtraction hybridization]*. Mol Biol (Mosk), 2002. **36**(6): p. 1002-11.

37. Van Regenmortel, M.F., CM.; Bishop, DHL.; Calisher, CH.; Carsten, EB.; Estes, MK.; Lemon, SM.; Maniloff, J.; Mayo, MA.; McGeoch, DJ.; Pringle, CR.; Wickner, RB, *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*". Academic Press, New-York, San Diego, 2002.
38. Bennett, M.D., et al., *Genomic characterization of a novel virus found in papillomatous lesions from a southern brown bandicoot (Isoodon obesulus) in Western Australia*. Virology, 2008. **376**(1): p. 173-82.
39. Woolford, L., et al., *A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (Perameles bougainville) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13280-90.
40. Kreider, J.W., et al., *Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata*. Nature, 1985. **317**(6038): p. 639-41.
41. Chan, S.Y., et al., *Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 3074-83.
42. de Villiers, E.M., *Cross-roads in the classification of papillomaviruses*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 2-10.
43. Aubin, F., et al., *Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV)*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(5): p. 610-5.
44. Bouvard, V., et al., *A review of human carcinogens--Part B: biological agents*. Lancet Oncol, 2009. **10**(4): p. 321-2.
45. IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2006. p. 22-23.
46. Bernard, H.U., S.Y. Chan, and H. Delius, *Evolution of papillomaviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **186**: p. 33-54.
47. de Villiers, E.M., L. Gissmann, and H. zur Hausen, *Molecular cloning of viral DNA from human genital warts*. J Virol, 1981. **40**(3): p. 932-5.
48. Chen, Z., et al., *Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1443-55.
49. Chen, Z., et al., *Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 7014-23.
50. Burk, R.D., A. Harari, and Z. Chen, *Human papillomavirus genome variants*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 232-43.
51. Gottschling, M., et al., *Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(5): p. 1242-58.
52. Cornet, I., et al., *Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR*. J Virol, 2012. **86**(12): p. 6855-61.
53. Zehbe, I., et al., *Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes*. Int J Cancer, 2001. **94**(5): p. 711-6.
54. Chen, Z., et al., *Evolution and taxonomic classification of alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72565.

55. Chen, Z., et al., *Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20183.
56. Doorbar, J., et al., *The biology and life-cycle of human papillomaviruses*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. F55-70.
57. Munoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
58. Cardoso, J.C. and E. Calonje, *Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review*. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat, 2011. **20**(3): p. 145-54.
59. Keefe, M., et al., *Butchers' warts: no evidence for person to person transmission of HPV7*. Br J Dermatol, 1994. **130**(1): p. 15-7.
60. Nucci, M.R. and E. Oliva, *Gynecologic Pathology*. 2009: Elsevier churchill livingstone.
61. Monsonego, J., *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus*, ed. Springer. 2007, Paris.
62. Hartley, C., et al., *Recurrent respiratory papillomatosis--the Manchester experience, 1974-1992*. J Laryngol Otol, 1994. **108**(3): p. 226-9.
63. Derkay, C.S., *Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995. **121**(12): p. 1386-91.
64. Carifi, M., et al., *Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives*. Ther Clin Risk Manag, 2015. **11**: p. 731-8.
65. Rodier, C., et al., *Juvenile respiratory papillomatosis: risk factors for severity*. J Med Virol, 2013. **85**(8): p. 1447-58.
66. Emsen, I.M. and M.E. Kabalar, *Epidermodysplasia verruciformis: An early and unusual presentation*. Can J Plast Surg, 2010. **18**(1): p. 21-4.
67. de Oliveira, W.R., et al., *Clinical aspects of epidermodysplasia verruciformis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2003. **17**(4): p. 394-8.
68. Kawai, T. and H.L. Malech, *WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease*. Curr Opin Hematol, 2009. **16**(1): p. 20-6.
69. de Martel, C., et al., *Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis*. Lancet Oncol, 2012. **13**(6): p. 607-15.
70. Zur Hausen, H., *The search for infectious causes of human cancers: where and why*. Virology, 2009. **392**(1): p. 1-10.
71. Gami, B., F. Kubba, and P. Ziprin, *Human papilloma virus and squamous cell carcinoma of the anus*. Clin Med Insights Oncol, 2014. **8**: p. 113-9.
72. Danaei, G., et al., *Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors*. Lancet, 2005. **366**(9499): p. 1784-93.
73. Schwartz, S.M., et al., *Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(21): p. 1626-36.
74. Rabkin, C.S., et al., *Second primary cancers following anal and cervical carcinoma: evidence of shared etiologic factors*. Am J Epidemiol, 1992. **136**(1): p. 54-8.
75. Garbuglia, A.R., *Human papillomavirus in head and neck cancer*. Cancers (Basel), 2014. **6**(3): p. 1705-26.
76. Ateenyi-Agaba, C., et al., *Human papillomavirus infection and squamous cell carcinoma of the conjunctiva*. Br J Cancer, 2010. **102**(2): p. 262-7.

77. Handisurya, A., et al., *Human papillomavirus type 26 infection causing multiple invasive squamous cell carcinomas of the fingernails in an AIDS patient under highly active antiretroviral therapy*. Br J Dermatol, 2007. **157**(4): p. 788-94.
78. Bosch, F.X., Y.L. Qiao, and X. Castellsague, *The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer*. International Journal of Gynecology and Obstetrics., 2006. **S8**(S21).
79. Syrjanen, K., et al., *Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population*. Sex Transm Dis, 1990. **17**(1): p. 15-9.
80. Collins, S., et al., *High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship*. BJOG, 2002. **109**(1): p. 96-8.
81. Smith, J.S., et al., *Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review*. J Adolesc Health, 2008. **43**(4 Suppl): p. S5-25, S25 e1-41.
82. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
83. Kahn, J.A., et al., *Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection*. Pediatrics, 2002. **109**(1): p. E5.
84. Rousseau, M.C., et al., *Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities*. Sex Transm Dis, 2003. **30**(7): p. 581-7.
85. Bosch, F.X. and T. Iftener, *The aetiology of cervical cancer*. Sheffield, UK: NHS Cervical Screening Programme., 2005.
86. Veldhuijzen, N.J., et al., *Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus*. Lancet Infect Dis, 2010. **10**(12): p. 862-74.
87. Burchell, A.N., et al., *Human papillomavirus infections among couples in new sexual relationships*. Epidemiology, 2010. **21**(1): p. 31-7.
88. Castellsague, X., et al., *Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia*. J Infect Dis, 1997. **176**(2): p. 353-61.
89. Underwood, S.M., et al., *What women in the United States Virgin Islands still want and need to know about HPV, cervical cancer, and condom use*. J Natl Black Nurses Assoc, 2010. **21**(1): p. 25-32.
90. Organisation mondiale de la Santé, *La lutte contre le cancer du col de l'utérus : guide des pratiques essentielles*. 2007.
91. Jordan, J., et al., *The cervix, 2nd Edition*. 2006: Wiley-Blackwell.
92. Richart, R.M., *Colpomicroscopic Studies of the Distribution of Dysplasia and Carcinoma in Situ on the Exposed Portion of the Human Uterine Cervix*. Cancer, 1965. **18**: p. 950-4.
93. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.
94. Egawa, K., *Do human papillomaviruses target epidermal stem cells?* Dermatology, 2003. **207**(3): p. 251-4.
95. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
96. Joyce, J.G., et al., *The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5810-22.

97. Giroglou, T., et al., *Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1565-70.
98. Culp, T.D., et al., *Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 8940-50.
99. Bousarghin, L., et al., *Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3846-50.
100. Li, M., et al., *Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2160-7.
101. Richards, R.M., et al., *Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1522-7.
102. Bergant Marusic, M., et al., *Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 455-67.
103. Rector, A., et al., *Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae*. Genome Biol, 2007. **8**(4): p. R57.
104. Wilson, V.G., et al., *Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features*. Virus Genes, 2002. **24**(3): p. 275-90.
105. Stacey, S.N., et al., *Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 7023-31.
106. Munger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11451-60.
107. Krawczyk, E., et al., *Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins*. Am J Pathol, 2008. **173**(3): p. 682-8.
108. Buck, C.B., et al., *Maturation of papillomavirus capsids*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2839-46.
109. Schiffman, M. and N. Wentzensen, *Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. **22**(4): p. 553-60.
110. Denis, F., S. Hanz, and S. Alain, *[Clearance, persistence and recurrence of HPV infection]*. Gynecol Obstet Fertil, 2008. **36**(4): p. 430-40.
111. Rositch, A.F., et al., *Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis*. Int J Cancer, 2013. **133**(6): p. 1271-85.
112. Richart, R.M., *Cervical intraepithelial neoplasia*. Pathol Annu, 1973. **8**: p. 301-28.
113. Darragh, T.M., et al., *The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*. Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(10): p. 1266-97.
114. Broders, A., *CARCINOMA IN SITU CONTRASTED WITH BENIGN PENETRATING EPITHELIUM*. JAMA, 1932. **99**(20):1670-1674.
115. Dalla Palma, P., et al., *The reproducibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study*. Am J Clin Pathol, 2009. **132**(1): p. 125-32.

116. Moscicki, A.B., et al., *Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. F24-33.
117. Luhn, P., et al., *The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer*. Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 265-70.
118. McCredie, M.R., et al., *Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study*. Lancet Oncol, 2008. **9**(5): p. 425-34.
119. Noel, J.C., et al., *Transformation of common warts into squamous cell carcinoma on sun-exposed areas in an immunosuppressed patient*. Dermatology, 1994. **189**(3): p. 308-11.
120. Munoz, N., et al., *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective*. Int J Cancer, 2004. **111**(2): p. 278-85.
121. Bosch, F.X., et al., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 796-802.
122. Badaracco, G., et al., *HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness*. J Med Virol, 2002. **67**(4): p. 574-82.
123. Bulk, S., et al., *Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands*. Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 171-5.
124. Welters, M.J., et al., *Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease*. Int J Cancer, 2006. **118**(4): p. 950-6.
125. Schwartz, S.M., et al., *Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study*. J Clin Oncol, 2001. **19**(7): p. 1906-15.
126. Ho, G.Y., et al., *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 423-8.
127. Trottier, H., et al., *Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(7): p. 1274-80.
128. Levi, J.E., et al., *High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3341-5.
129. Carcopino, X., et al., *Two years outcome of women infected with high risk HPV having normal colposcopy following low-grade or equivocal cytological abnormalities: are HPV16 and 18 viral load clinically useful predictive markers?* J Med Virol, 2012. **84**(6): p. 964-72.
130. Xi, L.F., et al., *Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study*. J Infect Dis, 2011. **203**(10): p. 1425-33.
131. Lo, K.W., et al., *Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in Chinese population*. J Clin Virol, 2005. **34**(1): p. 76-80.
132. Carcopino, X., et al., *Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy*. J Med Virol, 2006. **78**(8): p. 1131-40.
133. Trevisan, A., et al., *Human papillomavirus type 16 viral load measurement as a predictor of infection clearance*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 8): p. 1850-7.

134. Saunier, M., et al., *Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(11): p. 3678-85.
135. Weissenborn, S.J., et al., *Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(6): p. 2763-7.
136. Jia, M., et al., *HLA-DP is the cervical cancer susceptibility loci among women infected by high-risk human papillomavirus: potential implication for triage of human papillomavirus-positive women*. Tumour Biol, 2015.
137. Clifford, G.M., et al., *Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis*. AIDS, 2006. **20**(18): p. 2337-44.
138. Frisch, M., R.J. Biggar, and J.J. Goedert, *Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1500-10.
139. Grulich, A.E., et al., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
140. Jensen, K.E., et al., *Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up*. Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 234-9.
141. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical, C., et al., *Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1481-95.
142. Matsumoto, K., et al., *Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities*. Cancer Sci, 2010. **101**(9): p. 2065-73.
143. Giuliano, A.R., et al., *Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States)*. Cancer Causes Control, 2002. **13**(9): p. 839-46.
144. Koshiol, J., et al., *Smoking and time to clearance of human papillomavirus infection in HIV-seropositive and HIV-seronegative women*. Am J Epidemiol, 2006. **164**(2): p. 176-83.
145. Castellsague, X. and N. Munoz, *Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 20-8.
146. Moreno, V., et al., *Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1085-92.
147. Roura, E., et al., *The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147029.
148. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
149. La Vecchia, C., *Depot-medroxyprogesterone acetate, other injectable contraceptives, and cervical neoplasia*. Contraception, 1994. **49**(3): p. 223-30.
150. Yoo, Y.A., et al., *Progesterone signaling inhibits cervical carcinogenesis in mice*. Am J Pathol, 2013. **183**(5): p. 1679-87.

151. Chung, S.H., S. Franceschi, and P.F. Lambert, *Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer?* Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(8): p. 504-11.
152. Castle, P.E. and A.R. Giuliano, *Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 29-34.
153. Palefsky, J.M. and E.A. Holly, *Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 41-6.
154. *Cervical Cancer Screening (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
155. Liu, S., et al., *Cervical cancer in Canada: changing patterns in incidence and mortality.* Int J Gynecol Cancer, 2001. **11**(1): p. 24-31.
156. Centers for Disease, C. and Prevention, *FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010. **59**(20): p. 626-9.
157. Kirby, T., *FDA approves new upgraded Gardasil 9.* Lancet Oncol, 2015. **16**(2): p. e56.
158. Saville, A.M., *Cervical cancer prevention in Australia: Planning for the future.* Cancer Cytopathol, 2015.
159. Haghsheenas, M.R., et al., *Efficacy of Human Papillomavirus L1 Protein Vaccines (Cervarix and Gardasil) in Reducing the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Meta-analysis.* Int J Prev Med, 2017. **8**: p. 44.
160. Frappart, L., et al., *Histopathology and cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas*, Cédérom, Editor. 2004.
161. Nayar, R. and D.C. Wilbur, *The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain).* Acta Cytol, 2015. **59**(2): p. 121-32.
162. Apgar, B.S., L. Zoschnick, and T.C. Wright, Jr., *The 2001 Bethesda System terminology.* Am Fam Physician, 2003. **68**(10): p. 1992-8.
163. Solomon, D., et al., *The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.* JAMA, 2002. **287**(16): p. 2114-9.
164. Aslan, D.L., et al., *The Bethesda System 2001 recommendation for reporting of benign appearing endometrial cells in Pap tests of women age 40 years and older leads to unwarranted surveillance when followed without clinical qualifiers.* Gynecol Oncol, 2007. **107**(1): p. 86-93.
165. Jones, B.A. and D.A. Novis, *Cervical biopsy-cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22 439 correlations in 348 laboratories.* Arch Pathol Lab Med, 1996. **120**(6): p. 523-31.
166. Eddy, G.L., et al., *Biopsy findings in five hundred thirty-one patients with atypical glandular cells of uncertain significance as defined by the Bethesda system.* Am J Obstet Gynecol, 1997. **177**(5): p. 1188-95.
167. Canadian Task Force on Preventive Health, C., et al., *Recommendations on screening for cervical cancer.* CMAJ, 2013. **185**(1): p. 35-45.
168. Aristizabal, N., et al., *The impact of vaginal cytology on cervical cancer risks in Cali, Colombia.* Int J Cancer, 1984. **34**(1): p. 5-9.
169. Herrero, R., et al., *Screening for cervical cancer in Latin America: a case-control study.* Int J Epidemiol, 1992. **21**(6): p. 1050-6.

170. Monsonogo, J., *Infections à papillomavirus: État des connaissances, pratiques et prévention vaccinale*, ed. Springer. 2006, Paris.
171. Roche molecular diagnostics. *cobas® HPV Test* 2016; Available from: <http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobasHPVTest.aspx>.
172. Laine, S., *FDA Approves First Human Papillomavirus Test for Primary Cervical Cancer Screening*. 2014, U.S. Food and Drug Administration.
173. Canadian Task Force on Preventive Health Care. *Cervical Cancer—Guideline Presentation*. 2013 2016 [cited 2017 august 2017]; Presentation for free use to disseminate Guidelines]. Available from: <https://canadiantaskforce.ca/cervical-cancer-guideline-presentation/>.
174. Groupe de travail sur les lignes directrices pour le dépistage du cancer du col utérin au Québec, *Lignes directrices sur le dépistage du cancer du col utérin au Québec* D.d.r.b.e.d.l.s.a. travail, Editor. 2011.
175. Moyer, V.A. and U.S.P.S.T. Force, *Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement*. *Ann Intern Med*, 2012. **156**(12): p. 880-91, W312.
176. Ronco, G., et al., *Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials*. *Lancet*, 2014. **383**(9916): p. 524-32.
177. Khan, M.J. and K.K. Smith-McCune, *Treatment of cervical precancers: back to basics*. *Obstet Gynecol*, 2014. **123**(6): p. 1339-43.
178. Melnikow, J., et al., *Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(10): p. 721-8.
179. Cecchini, S., et al., *Re: Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(20): p. 1429-30.
180. The CoHIPP study team. *Colposcopy vs. HR-HPV testing to identify persistent/recurrent HSIL post-treatment: final results of the CoHIPP study*. in *International Federation Of Colposcopy and Cervical Pathology World Congress 2017*. 2017. Orlando, USA.
181. Arbyn, M., et al., *Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis*. *BMJ*, 2008. **337**: p. a1284.
182. Bruinsma, F., et al., *Precancerous changes in the cervix and risk of subsequent preterm birth*. *BJOG*, 2007. **114**(1): p. 70-80.
183. Lee, H.J., T.C. Park, and E.R. Norwitz, *Management of pregnancies with cervical shortening: a very short cervix is a very big problem*. *Rev Obstet Gynecol*, 2009. **2**(2): p. 107-15.
184. Behrman, R.E. and A.S. Butler, *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention*, in *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention*. 2007: Washington (DC).
185. Ortoft, G., et al., *After conisation of the cervix, the perinatal mortality as a result of preterm delivery increases in subsequent pregnancy*. *BJOG*, 2010. **117**(3): p. 258-67.
186. Ting, J., D.T. Kruzikas, and J.S. Smith, *A global review of age-specific and overall prevalence of cervical lesions*. *Int J Gynecol Cancer*, 2010. **20**(7): p. 1244-9.
187. Girard C., C.A.B., Azeredo A C., *Les naissances au Québec et dans les régions en 2015*, in *Coup d'oeil sociodémographique*. 2016.

188. Zhang, L., et al., *Discrepancies between biopsy-based and excision-based grading of cervical intraepithelial neoplasia: the important role of time between excision and biopsy*. Int J Gynecol Pathol, 2015. **34**(3): p. 221-7.
189. Ding, Z., et al., *Outcome of cervical intraepithelial neoplasia 2 diagnosed by punch biopsy in 131 women*. J Obstet Gynaecol Res, 2011. **37**(7): p. 754-61.
190. Sherman, M.E., et al., *Histopathologic extent of cervical intraepithelial neoplasia 3 lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance low-grade squamous intraepithelial lesion triage study: implications for subject safety and lead-time bias*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(4): p. 372-9.
191. Tarkowski, T.A., et al., *Improved detection of viral RNA isolated from liquid-based cytology samples*. Mol Diagn, 2001. **6**(2): p. 125-30.
192. Coutlee, F., et al., *Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(6): p. 1998-2006.
193. Depuydt, C.E., et al., *Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(12): p. 4073-7.
194. Gravitt, P.E., et al., *Improved amplification of genital human papillomaviruses*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(1): p. 357-61.
195. Coutlee, F., et al., *Confirmatory real-time PCR assay for human papillomavirus (HPV) type 52 infection in anogenital specimens screened for HPV infection with the linear array HPV genotyping test*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3821-3.
196. Evans, M.F., et al., *Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus*. BMC Clin Pathol, 2005. **5**: p. 10.
197. Venceslau, E.M., et al., *HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2014. **50**: p. 280-285.
198. Coutlee, F., et al., *Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids*. Public Health Genomics, 2009. **12**(5-6): p. 308-18.
199. Alvarez, J., et al., *Episomal and integrated human papillomavirus type 16 loads and anal intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive men*. AIDS, 2010. **24**(15): p. 2355-63.
200. Lefevre, J., et al., *Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and beta-globin DNA in cervicovaginal lavages*. J Virol Methods, 2003. **114**(2): p. 135-44.
201. Delius, H. and B. Hofmann, *Primer-directed sequencing of human papillomavirus types*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **186**: p. 13-31.
202. Hall, B.G., *Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(5): p. 1229-35.
203. Heinemeyer, T., et al., *Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(1): p. 362-7.
204. Hesselink, A.T., et al., *High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(2): p. 381-6.

205. Castle, P.E., et al., *Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(8): p. 2595-604.
206. Coglianò, V., et al., *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol, 2005. **6**(4): p. 204.
207. Coutlee, F., et al., *Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada*. J Med Virol, 2011. **83**(6): p. 1034-41.
208. Serrano, B., et al., *Human papillomavirus genotype attribution for HPV's 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions*. Eur J Cancer, 2015. **51**(13): p. 1732-41.
209. Origoni, M., et al., *"Low-grade positivity" of HPV viral load after atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) cytology identifies women at low-risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and 3*. Eur J Gynaecol Oncol, 2012. **33**(3): p. 261-4.
210. Sun, C.A., et al., *The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix*. Gynecol Oncol, 2001. **83**(1): p. 95-9.
211. Santos, A.L., et al., *Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion*. Sao Paulo Med J, 2003. **121**(6): p. 238-43.
212. Rebolj, M., et al., *Human papillomavirus testing in primary cervical screening and the cut-off level for hybrid capture 2 tests: systematic review*. BMJ, 2011. **342**: p. d2757.
213. Garland, S.M., et al., *Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-world Experience*. Clin Infect Dis, 2016. **63**(4): p. 519-27.
214. Gravitt, P.E., et al., *A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(5): p. 1248-54.
215. Sasaki, Y., et al., *Cervical Cancer Screening With Human Papillomavirus DNA and Cytology in Japan*. Int J Gynecol Cancer, 2017. **27**(3): p. 523-529.

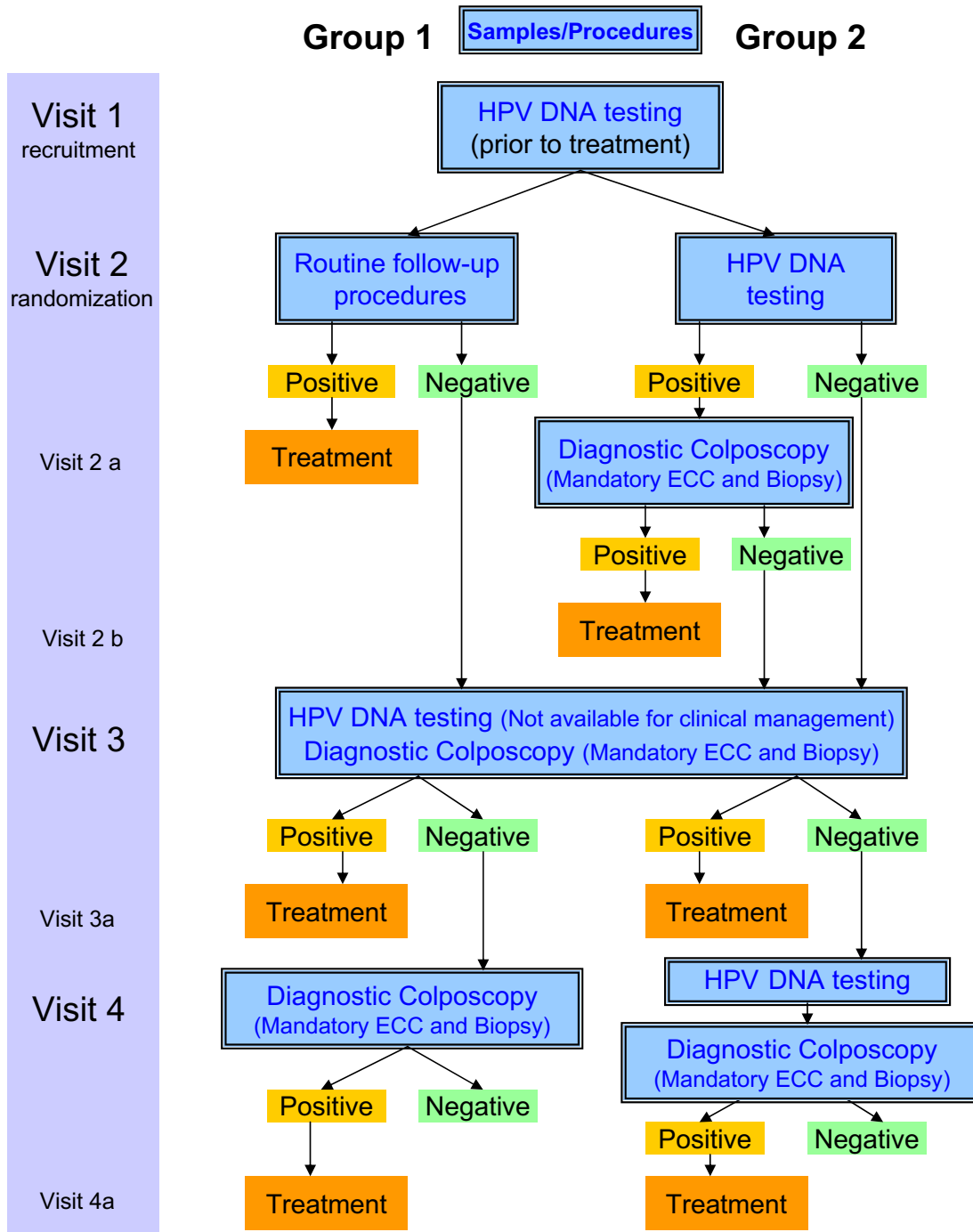
Annexe 1. Liste de centres de colposcopie inclus dans COHIPP

Colposcopy unit (City)	Collaborators	<u>Number recruited*</u>
CHUM, Hôpital St-Luc (Montreal)	MH Mayrand , S Ouellet, MJ Dupuis, R Michaud, B Lambert, I Brochu	311
CHUM, Hôpital Notre-Dame (Montreal)	P Sauthier , D Provencher, P Gauthier P Drouin, T Warkus	64
Jewish General Hospital (Montreal)	S Lau , A Ferenczy, C Ziegler, M Martin, W Gotlieb	264
CHUS (Sherbrooke)	P Bessette , G Waddell, MJ Côté, S Desindes, C Anku-Bertholet, YA Bureau, D Thibodeau	32
CHUQ (Quebec city)	M Plante , M Roy, MC Renaud, M Fortier, J Grégoire, G Bellemare, A Sebastianelli	120
QEII Health Sciences Centre (Halifax)	J Bentley , R Grimshaw, K Keiser, I Delisle, B Parish, W Lee, C Craig	204
Vancouver General Hospital (Vancouver)	T Ehlen , D Miller, M Heywood, S Finlayson, J McAlpine, G Stuart, J Kwon, L Sadownik, M Carey	335
CSSS de Chicoutimi (Chicoutimi)	P Fisch V Carré, J Dumont, S Gagnon, V Mareschal, F Simard, L Bouchard	40
Juravinski Cancer Center (Hamilton)	L Elit , R Ahmed, D Campeau, AM Chen, S Ellis, W Jimenez, J Lamont, M Lightheart, M Mangalougrou, J Mazurka, F Moens, C Sciarra	440
Regina General Hospital (Regina)	L Brydon , A. Akinbiyi, R. Bhargava, M. Cardoso, C. Jabs, H. Kamencic, C. Lett, L. Onasanya, A. Poole, D. Shepherd, J. Thiel	111
Foothills Medical Center (Calgary)	B. Hauck , J. Nation, W. Leung, G. Lam, W. Moscovitz, P. Martyn, A. Rosengarten, C. Lyndon, J. Jarrell, N. Galan, V. Chang, S. Watson, J. Mannerfeld, E. Wagner	195
Princess Margaret Hospital (Toronto)	J. Murphy , J Dodge, S Laframboise, S Ferguson, M Bernardini	60
Eastern Health (St. John's)	P. Power , E Bartellas, A Gill, R Kennedy, J White, C Cook, T Strand, L Dawson, C Popadiuk, K Brown, H Kravitz, N Kum, K Bajzak, V Martin, C Pike	20
Total		2196

*as of February 18th 2013; **In bold**, site PI ; First patient in CoHIPP, January 12, 2010. Number of trial centers differs from protocol, as centers were gradually added. Last center started recruitment in September 12th 2012 (Eastern Health).

Annexe 2: Organigramme de l'étude CoHIPP

CoHIPP study-Visit Flow-chart



Annexe 3. Résultats TFSEARCH pour le prototype VPH16

** TFSEARCH ver.1.3 ** (c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)

This simple routine searches highly correlated sequence fragments
versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database
by E.Wingender, R.Knueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).

<Warning> Scoring scheme is so straightforward in this version.

score = 100.0 * ('weighted sum' - min) / (max - min)

The score does not properly reflect statistical significance!

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998

Query: proto (750 bases)

Taxonomy: ALL

Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

1 GTATTGTATG TATGTTGAAT TAGTGTTGTT TGGTGTGTAT ATGTTTGTAT	entry	score
<-----	M00148 SRY	96.4
<-----	M00148 SRY	90.9
----->	M00012 CF2-II	90.3
----->	M00019 Dfd	87.5
----->	M00133 Tst-1	87.5
----->	M00099 S8	85.3

51 GTGCTTGTAT GTGCTTGTAAT ATATTAAGTT GTATGTGTGT TTGTATGTAT	entry	score
<-----	M00148 SRY	92.7
<-----	M00101 CdxA	87.9
<-----	M00101 CdxA	87.9
<-----	M00100 CdxA	87.2
----->	M00267 XFD-1	86.7
<-----	M00213 RAP1	86.1

101 GGTATAATAA ACACGTGTGT ATGTGTTTTT AAATGCTTGT GTAACATTATG	entry	score
----->	M00217 USF	94.1
<-----	M00217 USF	94.1
<-----	M00148 SRY	92.7
----->	M00101 CdxA	91.4
<-----	M00101 CdxA	91.4
----->	M00122 USF	91.2
<-----	M00122 USF	91.2
----->	M00123 c-Myc/	90.9

----->	M00064 PHO4	90.3	
<-----	M00055 N-Myc	88.7	
----->	M00119 Max	88.5	
<-----	M00119 Max	88.5	
<-----	M00100 CdxA	88.5	
---	M00229 Skn-1	88.4	
<-----	M00260 HLF	86.8	
<-----	M00228 VBP	86.4	
----->	M00055 N-Myc	85.9	
<-----	M00213 RAP1	85.8	
----->	M00268 XFD-2	85.7	
151 TGTCATGCAA CATAAATAAA CTTATTGTTT CAACACCTAC TAATTGTGTT	entry	score	
<-----	M00100 CdxA	100.0	
-	M00271 AML-1a	100.0	
<-----	M00101 CdxA	99.3	
<-----	M00042 Sox-5	94.1	
<-----	M00160 SRY	90.8	
<-----	M00019 Dfd	90.6	
<-----	M00099 S8	90.2	
<-----	M00148 SRY	90.0	
----->	M00229 Skn-1	88.4	
----->	M00101 CdxA	87.1	
----->	M00094 BR-C Z	86.8	
----->	M00096 Pbx-1	86.3	
----->	M00145 Brn-2	86.1	
----->	M00148 SRY	85.5	
201 GTGGTTATTC ATTGTATATA AACTATATTT GCTACATCCT GTTTTTGTTT	entry	score	
---->	M00271 AML-1a	100.0	
<-----	M00148 SRY	100.0	
<-----	M00032 c-Ets-	93.1	
-	M00012 CF2-II	92.9	
---	M00101 CdxA	92.9	
-	M00013 CF2-II	91.4	
<-----	M00129 HFH-1	90.8	
--	M00099 S8	90.2	
----->	M00131 HNF-3b	89.0	
----->	M00013 CF2-II	88.8	

	<-----	M00094 BR-C Z	88.7	
	<-----	M00074 c-Ets-	88.5	
----->		M00012 CF2-II	88.5	
<-----		M00013 CF2-II	87.9	
<-----		M00101 CdxA	87.9	
	<-----	M00093 BR-C Z	87.2	
<-----		M00100 CdxA	87.2	
	---	M00100 CdxA	87.2	
<-----		M00012 CF2-II	86.6	
	<-----	M00160 SRY	86.4	
	-----	M00110 Elf-1	86.0	
	<-	M00012 CF2-II	85.9	
<-----		M00268 XFD-2	85.7	
<-----		M00101 CdxA	85.7	
	<---	M00216 TATA	85.3	
----->		M00253 cap	85.3	
251	TATATATACT ATATTTTGTA GCGCCAGCGG CCATTTTGTA GCTTCAACCG	entry	score	
<-----		M00012 CF2-II	100.0	
<-----		M00013 CF2-II	100.0	
----->		M00012 CF2-II	92.9	
--->		M00101 CdxA	92.9	
----->		M00013 CF2-II	91.4	
----		M00094 BR-C Z	88.7	
----		M00093 BR-C Z	87.2	
--->		M00100 CdxA	87.2	
<-----		M00101 CdxA	87.1	
----->		M00101 CdxA	87.1	
--		M00160 SRY	86.4	
--->		M00110 Elf-1	86.0	
-----		M00012 CF2-II	85.9	
----->		M00101 CdxA	85.7	
<-----		M00101 CdxA	85.7	
	--	M00028 HSF	85.4	
-----		M00216 TATA	85.3	
	-----	M00181 E2	85.2	
	<-----	M00181 E2	85.2	
301	AATTCGGTTG CATGCTTTTT GGCACAAAAT GTGTTTTTTT AAATAGTTCT	entry	score	

	<----	M00029 HSF	100.0	
	<-----	M00148 SRY	92.7	
	<----	M00028 HSF	88.5	
	<-----	M00100 CdxA	88.5	
	<--	M00173 AP-1	87.6	
	<--	M00172 AP-1	87.6	
	----->	M00050 E2F	86.2	
-->		M00028 HSF	85.4	
<----		M00028 HSF	85.4	
----->		M00181 E2	85.2	
-----		M00181 E2	85.2	
351	ATGTCAGCAA CTATGGTTTA AACTTGTACG TTCCTGCTT GCCATGCGTG	entry	score	
-----		M00173 AP-1	87.6	
-----		M00172 AP-1	87.6	
	<----	M00029 HSF	86.9	
----->		M00253 cap	86.4	
	<--	M00050 E2F	86.2	
	<----	M00028 HSF	85.9	
401	CCAAATCCCT GTTTTCCTGA CCTGCACTGC TTGCCAACCA TTCCATTGTT	entry	score	
	<-----	M00042 Sox-5	92.8	
	<-----	M00160 SRY	91.7	
	<----	M00148 SRY	90.0	
	<-	M00022 Hb	88.4	
<----		M00029 HSF	86.9	
	<-----	M00029 HSF	86.3	
----		M00050 E2F	86.2	
<----		M00028 HSF	85.9	
	----->	M00226 P	85.6	
	-----	M00130 HFH-2	85.5	
451	TTTTACACTG CACTATGTGC AACTACTGAA TCACTATGTA CATTGTGTCA	entry	score	
--		M00042 Sox-5	92.8	
	<-----	M00253 cap	92.8	
	----	M00145 Brn-2	92.1	
---		M00160 SRY	91.7	
	<-----	M00199 AP-1	90.5	
-		M00148 SRY	90.0	
-----		M00022 Hb	88.4	

<-----	M00188 AP-1	88.2	
----->	M00253 cap	87.9	
<-----	M00173 AP-1	86.6	
----->	M00037 NF-E2	86.4	
<-----	M00204 GCN4	86.4	
<-----	M00174 AP-1	86.1	
	-- M00216 TATA	85.8	
---->	M00130 HFH-2	85.5	
----->	M00199 AP-1	85.5	
501 TATAAAATAA ATCACTATGC GCCAACGCCT TACATACCGC TGTTAGGCAC	entry	score	
<-----	M00101 CdxA	92.9	
----->	M00145 Brn-2	92.1	
<-----	M00101 CdxA	90.0	
<-----	M00100 CdxA	89.7	
----->	M00253 cap	87.9	
<-----	M00100 CdxA	87.2	
<-----	M00050 E2F	86.2	
----->	M00216 TATA	85.8	
<-----	M00045 E4BP4	85.8	
	< M00101 CdxA	85.0	
551 ATATTTTGG CTTGTTTAA CTAACCTAAT TGCATATTTG GCATAAGGTT	entry	score	
<-----	M00099 S8	91.4	
----->	M00241 Nkx-2	91.2	
<-----	M00148 SRY	90.9	
<-----	M00136 Oct-1	88.9	
----->	M00162 Oct-1	87.8	
----->	M00100 CdxA	87.2	
<-----	M00101 CdxA	85.7	
-----	M00101 CdxA	85.0	
<-----	M00101 CdxA	85.0	
601 TAAACTTCTA AGGCCAACTA AATGTCACCC TAGTTCATAC ATGAACTGTG	entry	score	
<-----	M00028 HSF	95.3	
<-----	M00029 HSF	93.7	
----->	M00253 cap	88.7	
----->	M00253 cap	86.6	

<---- M00029 HSF 86.3
 -----> M00029 HSF 86.3
 <----- M00031 MATalp 86.1

651 TAAAGGTTAG TCATACATTG TTCATTTGTA AAAC TGCACA TGGGTGTGTG entry score

<----- M00042 Sox-5 92.8
 -----> M00253 cap 89.9
 <----- M00253 cap 89.4
 <----- M00174 AP-1 87.8
 -----> M00100 CdxA 87.2
 -----> M00129 HFH-1 86.9
 -----> M00253 cap 86.6
 <----- M00217 USF 86.5
 <---- M00029 HSF 86.3
 -----> M00130 HFH-2 86.3

701 CAAACCGTTT TGGGTACAC ATTTACAAGC AAC T TATATA ATAATACTAA entry score

-----> M00101 CdxA 98.6
 -----> M00101 CdxA 92.9
 -----> M00101 CdxA 91.4
 <----- M00101 CdxA 91.4
 -----> M00101 CdxA 87.9
 -----> M00100 CdxA 87.2
 -----> M00101 CdxA 87.1
 -----> M00137 Oct-1 85.1

Total 150 high-scoring sites found., Max score: 100.0 point, Min score: 85.0 point TRANSFAC database document (Notice to users).

TFMATRIX: binding site distribution matrix Parallel Application Tsukuba Laboratory Home Page PAPIA system Top Page

Annexe 4. Résultats TFSEARCH pour la variante Sb-2 (mutation 7521)

TFSEARCH Search ResultTFSEARCH Search Result

** TFSEARCH ver.1.3 ** (c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)

This simple routine searches highly correlated sequence fragments

versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database

by E.Wingender, R.Knueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).

<Warning> Scoring scheme is so straightforward in this version.

score = 100.0 * ('weighted sum' - min) / (max - min)

The score does not properly reflect statistical significance!

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998

Query: proto (750 bases)

Taxonomy: ALL

Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

1 GTATTGTATG TATGTTGAAT TAGTGTGTGT TGTGTGTAT ATGTTTGTAT entry score

<----- M00148 SRY 96.4

<----- M00148 SRY 90.9

-----> M00012 CF2-II 90.3

-----> M00019 Dfd 87.5

-----> M00133 Tst-1 87.5

-----> M00099 S8 85.3

51 GTGCTTGTAT GTGCTTGTAATATTAAGTT GTATGTGTGT TTGTATGTAT entry score

<----- M00148 SRY 92.7

<----- M00101 CdxA 87.9

<----- M00101 CdxA 87.9

<----- M00100 CdxA 87.2

-----> M00267 XFD-1 86.7

<----- M00213 RAP1 86.1

101 GGTATAATAA ACACGTGTGT ATGTGTTTTT AAATGCTTGT GTAACCTATTG entry score

-----> M00217 USF 94.1

<----- M00217 USF 94.1

<----- M00148 SRY 92.7

-----> M00101 CdxA 91.4

<-----	M00101 CdxA	91.4	
----->	M00122 USF	91.2	
<-----	M00122 USF	91.2	
----->	M00123 c-Myc/	90.9	
----->	M00064 PHO4	90.3	
<-----	M00055 N-Myc	88.7	
----->	M00119 Max	88.5	
<-----	M00119 Max	88.5	
<-----	M00100 CdxA	88.5	
---	M00229 Skn-1	88.4	
<-----	M00260 HLF	86.8	
<-----	M00228 VBP	86.4	
----->	M00055 N-Myc	85.9	
<-----	M00213 RAP1	85.8	
----->	M00268 XFD-2	85.7	
151 TGTCATGCAA CATAAATAAA CTTATTGTTT CAACACCTAC TAATTGTGTT	entry	score	
<-----	M00100 CdxA	100.0	
-	M00271 AML-1a	100.0	
<-----	M00101 CdxA	99.3	
<-----	M00042 Sox-5	94.1	
<-----	M00160 SRY	90.8	
<-----	M00019 Dfd	90.6	
<-----	M00099 S8	90.2	
<-----	M00148 SRY	90.0	
----->	M00229 Skn-1	88.4	
----->	M00101 CdxA	87.1	
----->	M00094 BR-C Z	86.8	
----->	M00096 Pbx-1	86.3	
----->	M00145 Brn-2	86.1	
----->	M00148 SRY	85.5	
201 GTGGTTATTC ATTGTATATA AACTATATTT GCTACATCCT GTTTTTGTTT	entry	score	
----->	M00271 AML-1a	100.0	
<-----	M00148 SRY	100.0	
<-----	M00032 c-Ets-	93.1	
-	M00012 CF2-II	92.9	
---	M00101 CdxA	92.9	

	- M00013 CF2-II 91.4	
	<----- M00129 HFH-1 90.8	
--	M00099 S8 90.2	
	-----> M00131 HNF-3b 89.0	
	-----> M00013 CF2-II 88.8	
	<----- M00094 BR-C Z 88.7	
	<----- M00074 c-Ets- 88.5	
	-----> M00012 CF2-II 88.5	
	<----- M00013 CF2-II 87.9	
	<----- M00101 CdxA 87.9	
	<----- M00093 BR-C Z 87.2	
	<----- M00100 CdxA 87.2	
	--- M00100 CdxA 87.2	
	<----- M00012 CF2-II 86.6	
	<----- M00160 SRY 86.4	
	----- M00110 Elf-1 86.0	
	<- M00012 CF2-II 85.9	
	<----- M00268 XFD-2 85.7	
	<----- M00101 CdxA 85.7	
	<--- M00216 TATA 85.3	
	-----> M00253 cap 85.3	
251	TATATATACT ATATTTTGTA GCGCCAGCGG CCATTTTGTA GCTTCAACCG	entry score
	<----- M00012 CF2-II 100.0	
	<----- M00013 CF2-II 100.0	
	-----> M00012 CF2-II 92.9	
	---> M00101 CdxA 92.9	
	-----> M00013 CF2-II 91.4	
	---- M00094 BR-C Z 88.7	
	---- M00093 BR-C Z 87.2	
	---> M00100 CdxA 87.2	
	<----- M00101 CdxA 87.1	
	-----> M00101 CdxA 87.1	
--	M00160 SRY 86.4	
	---> M00110 Elf-1 86.0	
	----- M00012 CF2-II 85.9	
	-----> M00101 CdxA 85.7	
	<----- M00101 CdxA 85.7	

```

-- M00028 HSF 85.4
----- M00216 TATA 85.3
----- M00181 E2 85.2
<----- M00181 E2 85.2
301 AATTCGGTTG CATGCTTTTT GGCACAAAAT GTGTTTTTTT AAATAGTTCT entry score
<---- M00029 HSF 100.0
<----- M00148 SRY 92.7
<---- M00028 HSF 88.5
<----- M00100 CdxA 88.5
<-- M00173 AP-1 87.6
<-- M00172 AP-1 87.6
-----> M00050 E2F 86.2
--> M00028 HSF 85.4
<---- M00028 HSF 85.4
-----> M00181 E2 85.2
----- M00181 E2 85.2
351 ATGTCAGCAA CTATAGTTTA AACTTGACG TTCCTGCTT GCCATGCGTG entry score
----- M00173 AP-1 87.6
----- M00172 AP-1 87.6
<---- M00029 HSF 86.9
-----> M00253 cap 86.4
<-- M00050 E2F 86.2
<---- M00028 HSF 85.9
401 CCAAATCCCT GTTTTCCTGA CCTGCACTGC TTGCCAACCA TTCCATTGTT entry score
<----- M00042 Sox-5 92.8
<----- M00160 SRY 91.7
<----- M00148 SRY 90.0
<- M00022 Hb 88.4
<---- M00029 HSF 86.9
<---- M00029 HSF 86.3
----- M00050 E2F 86.2
<---- M00028 HSF 85.9
-----> M00226 P 85.6
----- M00130 HFH-2 85.5
451 TTTTACACTG CACTATGTGC AACTACTGAA TCACTATGTA CATTGTGTCA entry score
-- M00042 Sox-5 92.8

```

<-----	M00253 cap	92.8	
----	M00145 Brn-2	92.1	
---	M00160 SRY	91.7	
<-----	M00199 AP-1	90.5	
-	M00148 SRY	90.0	
-----	M00022 Hb	88.4	
<-----	M00188 AP-1	88.2	
----->	M00253 cap	87.9	
<-----	M00173 AP-1	86.6	
----->	M00037 NF-E2	86.4	
<-----	M00204 GCN4	86.4	
<-----	M00174 AP-1	86.1	
--	M00216 TATA	85.8	
---->	M00130 HFH-2	85.5	
----->	M00199 AP-1	85.5	
501 TATAAAATAA ATCACTATGC GCCAACGCCT TACATACCGC TGTTAGGCAC	entry	score	
<-----	M00101 CdxA	92.9	
----->	M00145 Brn-2	92.1	
<-----	M00101 CdxA	90.0	
<-----	M00100 CdxA	89.7	
----->	M00253 cap	87.9	
<-----	M00100 CdxA	87.2	
<-----	M00050 E2F	86.2	
----->	M00216 TATA	85.8	
<-----	M00045 E4BP4	85.8	
< M00101 CdxA		85.0	
551 ATATTTTGG CTTGTTTAA CTAACCTAAT TGCATATTTG GCATAAGGTT	entry	score	
<-----	M00099 S8	91.4	
----->	M00241 Nkx-2	91.2	
<-----	M00148 SRY	90.9	
<-----	M00136 Oct-1	88.9	
----->	M00162 Oct-1	87.8	
----->	M00100 CdxA	87.2	
<-----	M00101 CdxA	85.7	
-----	M00101 CdxA	85.0	
<-----	M00101 CdxA	85.0	
601 TAAACTTCTA AGGCCAACTA AATGTCACCC TAGTTCATAC ATGAACTGTG	entry	score	

<----	M00028 HSF	95.3
<----	M00029 HSF	93.7
----->	M00253 cap	88.7
----->	M00253 cap	86.6
<----	M00029 HSF	86.3
---->	M00029 HSF	86.3
<-----	M00031 MATalp	86.1

651 TAAAGGTTAG TCATACATTG TTCATTTGTA AAAC TGCACA TGGGTGTGTG entry score

<-----	M00042 Sox-5	92.8
----->	M00253 cap	89.9
<-----	M00253 cap	89.4
<-----	M00174 AP-1	87.8
----->	M00100 CdxA	87.2
----->	M00129 HFH-1	86.9
----->	M00253 cap	86.6
<-----	M00217 USF	86.5
<----	M00029 HSF	86.3
----->	M00130 HFH-2	86.3

701 CAAACCGTTT TGGGTTACAC ATTTACAAGC AAC TTATATA ATAATACTAA entry score

----->	M00101 CdxA	98.6
----->	M00101 CdxA	92.9
----->	M00101 CdxA	91.4
<-----	M00101 CdxA	91.4
----->	M00101 CdxA	87.9
----->	M00100 CdxA	87.2
----->	M00101 CdxA	87.1
----->	M00137 Oct-1	85.1

Total 150 high-scoring sites found. Max score: 100.0 point, Min score: 85.0 point

TRANSFAC database document (Notice to users) TFMATRIX: binding site distribution matrix

Parallel Application Tsukuba Laboratory Home Page PAPIA system Top Page

Annexe 5. Permission d'utilisation de figures

1) Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond), 110(5), 525-541. doi:10.1042/CS20050369

Request: Authors may reproduce an article, in whole or in part, in a thesis or dissertation at no cost providing the original source is attributed.

2) Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology, 401(1), 70-79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 21, 2016

This Agreement between Nadège Zanré ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3893811189390
License date	Jun 21, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Virology
Licensed Content Title	Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments
Licensed Content Author	Hans-Ulrich Bernard, Robert D. Burk, Zigu Chen, Koenraad van Doorslaer, Harald zur Hausen, Ethel-Michele de Villiers
Licensed Content Date	25 May 2010
Licensed Content Volume Number	401
Licensed Content Issue Number	1
Licensed Content Pages	10

Start Page	70
End Page	79
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Français
Order reference number	
Original figure numbers	figure 3
Title of your thesis/dissertation	Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux
Expected completion date	Aug 2016
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Nadège Zanré 900 saint-denis Montreal, QC H2X 0A9 Canada Attn: Nadège Zanré
Total	0.00 USD

3) Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 25, 2017

This Agreement between Nadège Zanré ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4135750787090
License date	Jun 25, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Publication	Content Vaccine
Licensed Content Title	The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses
Licensed Content Author	John Doorbar,Wim Quint,Lawrence Banks,Ignacio G. Bravo,Mark Stoler,Tom R. Broker,Margaret A. Stanley
Licensed Content Date	Nov 20, 2012
Licensed Content Volume	30
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	16
Start Page	F55
End Page	F70
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Français
Order reference number	

Original figure numbers

Title of your thesis/dissertation Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux

Expected completion date Jul 2017

Estimated size (number of pages) 150

Elsevier VAT number GB 494 6272 12

Requestor Location Nadège Zané
900 rue saint-denis

Montréal, QC H2X0A9
Canada
Attn: Nadège Zané

Total 0.00 CAD

4) Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical VPH infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, 7(1), 11-22. doi:10.1038/nrc205

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 21, 2016

This Agreement between Nadège Zané ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number 3893851325178

License date Jun 21, 2016

Licensed Content Publisher Nature Publishing Group

Licensed Content Publication Nature Reviews Cancer

Licensed Content Title The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues

Licensed Content Author	Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins, Lawrence S. Young
Licensed Content Date	Jan 1, 2007
Licensed Content Volume Number	7
Licensed Content Issue Number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1 l
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux
Expected completion date	Aug 2016
Estimated size (number of pages)	150
Requestor Location	Nadège Zanré 900 saint-denis Montreal, QC H2X 0A9 Canada Attn: Nadège Zanré
Billing Type	Invoice

Billing Address	Nadège Zanré 900 saint-denis Montreal, QC H2X 0A9 Canada Attn: Nadège Zanré
Total	0.00 USD

5) Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical VPH infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, 7(1), 11-22. doi:10.1038/nrc2050

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Jun 21, 2016	
<hr/> <hr/>	
This Agreement between Nadège Zanré ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.	
License Number	3893851325178
License date	Jun 21, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature Reviews Cancer
Licensed Content Title	The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues
Licensed Content Author	Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins, Lawrence S. Young
Licensed Content Date	Jan 1, 2007
Licensed Content Volume Number	7

Licensed Content Issue Number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux
Expected completion date	Aug 2016
Estimated size (number of pages)	150
Requestor Location	Nadège Zanré 900 saint-denis Montreal, QC H2X 0A9 Canada Attn: Nadège Zanré
Billing Type	Invoice
Billing Address	Nadège Zanré 900 saint-denis Montreal, QC H2X 0A9 Canada Attn: Nadège Zanré

Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Tableau 1: Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F. Group, W. H. O. I. A. f. R. o. C. M. W. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. Lancet Oncol, 10(4), 321-322. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698>

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 25, 2017

This Agreement between Nadège Zanré ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4135751240587
License date	Jun 25, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Publication	Content The Lancet Oncology
Licensed Content Title	A review of human carcinogens—Part B: biological agents
Licensed Content Author	Véronique Bouvard,Robert Baan,Kurt Straif,Yann Grosse,Béatrice Secretan,Fatiha El Ghissassi,Lamia Benbrahim-Tallaa,Neela Guha,Crystal Freeman,Laurent Galichet,Vincent Coglianò
Licensed Content Date	Apr 1, 2009
Licensed Content Volume	10
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	2
Start Page	321
End Page	322
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1

Format both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article? No

Will you be translating? Yes

Number of languages 1

Languages Français

Order reference number

Original figure numbers

Title of your thesis/dissertation Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux

Expected completion date Jul 2017

Estimated size (number of pages) 150

Elsevier VAT number GB 494 6272 12

Requestor Location Nadège 900 rue Zané saint-denis

Montréal, Canada QC H2X0A9

Attn: Nadège Zané

Total 0.00 CAD

Tableau 2 : Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain). *Acta Cytol*, 59(2), 121-132. doi:10.1159/000381842

Licensed Content Publisher	Karger Publishers
Licensed Content Publication	Acta Cytologica
Licensed Content Title	The Pap Test and Bethesda 2014
Licensed copyright line	Copyright © 2015, Karger Publishers
Licensed Content Author	Nayar Ritu, Wilbur David C.

Licensed Content Date	May 19, 2015
Licensed Content Volume	59
Licensed Content Issue	2
Special issue or supplement	
Type of use	Thesis/Dissertation
Requestor type	student
Format	Print, Electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Include Image file	no
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition/presentation
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	yes
For distribution to	Worldwide
Specific languages	French, English
Lifetime unit quantity of new product	1
The requesting person/organization	Centre de Recherche du CHUM
Order reference number	

Title of your thesis / dissertation	Discordance entre la biopsie diagnostique et l'histologie de traitement: les déterminants viraux
Expected completion date	Jan 2017
Estimated size (number of pages)	120
Requestor Location	Nadège Zanré 900 rue saint-denis Montréal, QC H2X0A9 Canada Attn: Nadège Zanré
Publisher Tax ID	980406204
Total	0.00 CAD